

## **INFORMATION TO USERS**

This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.** Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.

Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.

Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.

Bell & Howell Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600

**UMI<sup>®</sup>**



UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE PRODUCTION DE CHAMPIGNONS  
ENDOMYCORHIZIENS EN BIORÉACTEUR

MARIO JOLICOEUR  
DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)  
(GÉNIE CHIMIQUE)  
JUILLET 1998

© Mario Jolicoeur, 1998.



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-46634-5

**Canada**



UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

OPTIMISATION D'UN PROCÉDÉ DE PRODUCTION DE CHAMPIGNONS  
ENDOMYCORHIZIENS EN BIORÉACTEUR

présentée par : JOLICOEUR Mario

en vue de l'obtention du diplôme de : *Philosophiae Doctor*

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

M. LEGROS Robert, Ph.D., Président

M. PERRIER Michel, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. BÉCARD Guillaume, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. BUSCHMANN Micheal, Ph.D., membre

M. PIRET James M., Ph.D., membre

À Thomas et Louis

## REMERCIEMENTS

Je tiens, tout d'abord, à remercier mes directeurs, Guillaume Bécard de l'Université Paul-Sabatier (Toulouse) et Michel Perrier de l'École Polytechnique pour m'avoir guidé tout au long de cette thèse. Le premier pour avoir su élargir ma vision macroscopique d'ingénieur aux phénomènes microscopiques de la physiologie cellulaire. Le deuxième pour une patience et une compréhension qui n'ont d'égal que sa rigueur scientifique. Je tiens, surtout, à souligner la disponibilité sans borne qu'ils m'ont offerte et que j'ai particulièrement appréciée. Je ne saurais passer sous silence la 104 de Guillaume Bécard qui a beaucoup contribué à ma rapide intégration et à mon attachement profond à la région Midi-Pyrénées.

Je voudrais remercier Messieurs Robert Legros, Micheal Buschmann, James M. Piret, ainsi que le représentant du doyen, Monsieur Daniel Leblanc, pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture et à la critique de ma thèse.

Suite à ces travaux de doctorat, je me dois de souligner la gratitude que je porte à Claude Chavarie et à Jean Archambault pour m'avoir initié à la biotechnologie et m'avoir permis de participer aux tous premiers travaux sur les endomycorhizes en bioréacteurs. À ce sujet, je tiens à souligner l'apport important de Jean-André Fortin aux connaissances que j'ai pu acquérir sur les champignons endomycorhiziens.

La réalisation de cette thèse n'aurait pu être possible dans sa forme actuelle sans l'aide généreuse et appréciée des collègues côtoyés au laboratoire. Je tiens à remercier Martin Gaudette pour une générosité sans pareille et une humeur à toute épreuve, Laurence Lamboursain pour des discussions toujours éclairées, Dany Aubry et Édith Bouchard-Marchand pour une aide appréciée, Robert D. Williams pour une préparation méthodique des inocula et quelques conseils utiles, Luc Lavoie et Steve Fiset pour des résultats d'analyses de chromatographie ionique et de glucides toujours précis.

Il y a les gens du labo, il y a aussi ceux de la compagnie Premier Tech Ltée qui ont toujours su m'encourager dans ces travaux: Suzan Parent, Serge Gagné, Peter Motouglis et Javier Villegas.

Je tiens à remercier particulièrement Marie-Josée Santoire, ma compagne, grâce à qui je me suis intéressé avec autant de passion aux endomycorhizes.

Merci à Louis Malle et Miles Davis pour leur *Ascenseur pour l'échafaud* qui m'a porté au cours de la rédaction de cette thèse.

## RÉSUMÉ

Les champignons endomycorhiziens sont des microorganismes qui se développent à la fois à l'intérieur des tissus racinaires d'une plante et dans le sol. Ces organismes sont des symbiotes obligatoires qui coexistent avec les plantes terrestres depuis le tout début de leur évolution. Cette association plante/champignon intéresse les communautés scientifique et agronomique mondiales car ces champignons contribuent à améliorer la nutrition des plantes ainsi que la structure des sols, tout en induisant une résistance accrue des plantes aux agressions biotiques et abiotiques. La disponibilité de ces champignons sur le marché mondial demeure cependant limitée, faute d'un procédé de production à une échelle industrielle adéquate. La faisabilité de la production de champignons endomycorhiziens en bioréacteurs a été établie par l'auteur lors de travaux antérieurs mais le peu de connaissances des phénomènes biologiques impliqués dans la croissance du champignon a limité les productivités à des valeurs ne justifiant pas la transposition des systèmes bioréacteurs à l'échelle industrielle.

Cette thèse de doctorat propose de caractériser le comportement des symbiotes champignons endomycorhiziens / racines transformées de plantes par des études conciliées de leur physiologie et de leur nutrition en vue d'optimiser la productivité en propagules de champignons en bioréacteur.

Un procédé de production de propagules du champignon endomycorhizien à arbuscules et à vésicules *Glomus intraradices* en bioréacteur gazo-siphon a été validé par la co-culture sur des racines transformées de carotte en milieu minimal (M) liquide.

Les conditions d'une culture submergée en bioréacteur gazo-siphon permettent de maintenir l'état de mycorhization des racines tout au long des cultures. Cependant, la production de vésicules n'est pas favorisée.

L'étude des conditions d'inoculation a révélé une concentration critique en inoculum au-delà duquel aucun accroissement de la masse racinaire n'est observé.

Un premier outil de compréhension de la relation symbiotique a été développé. Il s'agit d'un bioessai permettant d'évaluer en temps réel les réactions instantanées et en régime établi d'un champignon face à divers composés et environnements de culture. Une technique de mesure en temps réel du pH cytosolique à titre de marqueur physiologique a été développée avec l'utilisation d'une sonde cytochimique et de mesures ratiométriques. Les champignons *Gigaspora margarita* et *G. intraradices* ont été étudiés.

Un profil caractéristique de distribution du pH cytosolique a été observé le long des hyphes et la magnitude de ce profil pH a pu être modulée selon l'état physiologique

des champignons. Le profil pH le plus élevé pour le champignon a été obtenu lorsque les racines étaient en état de stress osmotique et/ou nutritionnel.

Un deuxième outil d'optimisation a été développé avec la mise au point d'un modèle biocinétique structuré décrivant la relation symbiotique. L'étude a été basée sur l'implication de pools intracellulaires en ion phosphate (Pi) et sur la concentration intraracinaire en glucides sur le développement du champignon *G. intraradices*.

Les résultats de simulations du modèle supportent l'hypothèse que le niveau des réserves intracellulaires en Pi des racines représente une clef décisionnelle pour le champignon pour croître (réserves = 0) ou cesser de croître (réserves > 0). Le modèle arrive à prédire une diminution du taux de croissance des racines mycorhizées par rapport aux racines non-mycorhizées, tel qu'observé expérimentalement, en suggérant que le champignon compétitionne sa racine-hôte pour ses glucides intracellulaires.

Les résultats appuient l'hypothèse que la production des spores du champignon *G. intraradices* est conditionnée par une problématique nutritionnelle. Cependant, les expressions des taux spécifiques de croissance de la racine et du champignon doivent être reformulées afin de tenir compte du rôle possible du nitrate en tant que deuxième clef décisionnelle.

Des travaux d'optimisation de la configuration et de l'opération du bioréacteur ont été réalisés avec un bioréacteur permettant une culture aéroponique alimentée en milieu

nutritif par atomisation, présenté dans la littérature pour la culture de racines transformées. Des performances d'un même ordre de grandeur qu'avec des cultures en bioréacteur gazo-siphon et un taux spécifique de croissance similaire aux cultures submergées ont été observées.

Le procédé de production a été orienté vers une culture en deux étapes : une première étape favorisant la croissance des racines par l'utilisation d'un milieu de culture enrichi et une deuxième favorisant la croissance du champignon par un milieu de culture dilué en glucides et en sels minéraux.

L'ajout d'un lit de grains de perlite a permis de compartimenter le développement des racines et du champignon dans le lit. Les niveaux de production de spores ont été augmentés par un facteur de 50, passant d'environ 5 000 spores par culture en bioréacteur gazo-siphon à près de 280 000 spores par bioréacteur de 1 L opéré en mode brouillard en 120 jours. La production de vésicules, pour sa part, est passée de quelques centaines (gazo-siphon) à plus de 80 000 par culture. L'objectif d'optimisation de la production de propagules (spores et vésicules) en bioréacteur a été rencontré.

L'ensemble des résultats obtenus suggèrent que le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* doit, dans un premier temps, compléter une croissance extraracinaire avant d'être en mesure de compléter une croissance intraracinaire. De



plus, il semble que l'imposition d'un stress osmotique et/ou nutritionnel favorisera le développement du champignon là où il est rendu dans son cycle de développement.

## ABSTRACT

Arbuscular mycorrhizal fungi are obligate symbionts requiring a host plant to survive. These fungi develop extraradicle and intraradicle hyphal network. The association of arbuscular mycorrhizal fungi with terrestrial vascular plants goes back to the Devonian times. This symbiotic association is of high interest for its utilisation in agriculture and horticulture since it has been shown to improve plant nutrition and resistance against plant pathogens, as well as soil structure. Because of a lack of technologies for large scale industrial production of fungi propagules, their availability on the world market is still limited. The author has proved, in previous work, the feasibility of the use of bioreactors to produce endomycorrhizal propagules. However, the low level of knowledge of the biological phenomena involved in the symbiosis has limited the bioprocess productivity to values that could not be profitable commercially.

This Ph.D. thesis proposes to characterize the behaviour of the arbuscular mycorrhizal fungus/hairy root symbionts by nutritional and physiological studies in order to optimize the fungus propagule productivity in bioreactor.

An airlift bioreactor has been validated as a potential culture system for the production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on *Daucus carota* hairy roots using minimal (M) liquid medium. Submerged culture conditions maintained

root mycorrhization with negligible amount of vesicles. A critical inoculum concentration was found above which the root growth is significantly reduced.

A first tool for the comprehension of the symbiotic relationship was developed. It consisted in a bioassay allowing real-time observation of transient and steady-state reactions of arbuscular mycorrhizal fungi against diverse compounds and culture environments. The technique is based on a real-time measurement of the fungus cytosolic pH as a physiological marker using a molecular probe and ratiometric measurements. A characteristic apical pH profile was described and the highest pH profile was observed for extraradical hyphae of mycorrhizal hairy roots under osmotic and/or nutritional stresses.

A second comprehensive tool was developed as a structured biokinetic model describing the symbiotic relationship. The study was based on intracellular inorganic phosphate (Pi) pools and sugar concentration. Simulation results support the root intracellular Pi storage to be a decision key for the extraradical fungus to grow (storage = 0) or to cease its growth (storage > 0). The model was efficient in predicting the decrease of the root specific growth rate observed experimentally for the mycorrhizal roots as compared to non-mycorrhizal, showing the fungus to be a competitor for the root intracellular sugar. Results suggest that the extraradical spore production is driven by a nutritional problem. However, the specific growth rate

expressions of the roots and the fungus should be modified in order to include nitrate ion as a possible decisional key.

The bioreactor configuration for propagule production has been optimized using a bioreactor allowing aeroponic culture conditions with liquid medium fed as a mist. This configuration is presented in the literature for the culture of hairy roots. The propagule productivity showed the same order of magnitude as in the airlift bioreactor and the specific mycorrhizal root growth rate was similar to the one observed in submerged liquid cultures.

The production process was separated in two steps: a first step favouring the root growth using an enriched culture medium, followed by a step favouring the fungus growth using a medium diluted in mineral salts and sugar. The addition of a bed made of perlite particles allowed the fungus to grow within the bed and imposed a compartmentation of the culture. The spore production level increased by a factor of 50, from an average of 5 000 spores to 280 000 spores per bioreactor in 120 d. The production of vesicles increased from hundreds to 80 000 per bioreactor. The objective to optimise the productivity in propagules in a bioreactor was met for both spore and vesicle productions. The results also suggest that the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* requires extraradical growth before its intraradical one and that an osmotic and/or nutritional stress will favour the fungus growth at its developmental cycle.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE .....iv

REMERCIEMENTS .....v

RÉSUMÉ .....vii

ABSTRACT .....xii

LISTE DES TABLEUX .....xxiii

LISTE DES FIGURES .....xxiv

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....xi

LISTE DES ANNEXES .....xlix

CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION GÉNÉRALE .....1

1.1 L'OBJET DE RECHERCHE .....1

1.1.1 Les plantes vasculaires .....2

1.1.1.1 Le réseau racinaire .....4

1.1.1.2 L'absorption des éléments nutritifs .....6

1.1.1.3 Les adaptations aux stress environnementaux .....14

1.1.2 Le champignon mycorhizien à arbuscules: un symbiote obligatoire .....17

1.1.3 L'établissement d'une relation symbiotique .....20

1.1.3.1 Les réseaux mycélien et racinaire: les vases communicants .....	22
1.2 PROBLÉMATIQUE DE LA PRODUCTION À GRANDE ÉCHELLE DE PROPAGULES DE CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS À ARBUSCULES...	25
1.2.1 L'intérêt commercial .....	25
1.2.2 Les moyens de production actuels d'inoculants mycorhiziens à arbuscules.....	26
1.2.3 Le développement d'un procédé de deuxième génération .....	27
1.2.3.1 La culture dualiste in vitro.....	27
1.2.3.2 L'approche en bioréacteur .....	29
1.3 OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	34
1.4 ORGANISATION DE LA THÈSE.....	37
<b>CHAPITRE II : PRODUCTION OF AM FUNGI PROPAGULES IN AN AIRLIFT BIOREACTOR .....</b>	<b>39</b>
<b>MANUSCRIT #1 : PRODUCTION OF AM FUNGI PROPAGULES IN AN AIRLIFT BIOREACTOR .....</b>	<b>41</b>
2.1 SUMMARY .....	41
2.2 KEY WORDS .....	43
2.3 INTRODUCTION.....	43
2.4 MATERIALS AND METHODS .....	46
2.4.1 Hairy Root and AM Fungi Cultures .....	46
2.4.2 Airlift Bioreactor .....	48
2.4.3 Analytical.....	50

2.4.3.1 Sampling and Harvesting.....	50
2.4.3.2 Measurement of Propagule Production .....	50
2.4.3.3 Extracellular Nutrient Analysis .....	51
2.5 RESULTS .....	52
2.5.1 Liquid Cultures in Petri Dishes .....	53
2.5.2 Airlift Bioreactor Cultures.....	58
2.6 DISCUSSION.....	62
2.6.1 Growth of Mycorrhized Hairy Roots in Submerged Cultures.....	62
2.6.2 Mycorrhized Hairy Roots Nutrition .....	64
2.6.3 AM Fungi Propagule Production.....	65
2.7 ACKNOWLEDGEMENTS.....	68
2.8 REFERENCES .....	69
 <b>CHAPITRE III : INTRACELLULAR PH IN AM FUNGI: A SYMBIOTIC PHYSIOLOGICAL MARKER.....</b>	 <b>78</b>
 <b>MANUSCRIT #2 : INTRACELLULAR PH IN AM FUNGI: A SYMBIOTIC PHYSIOLOGICAL MARKER.....</b>	 <b>80</b>
3.1 FINANCIAL SUPPORT .....	80
3.2 ABBREVIATION .....	81
3.3 ABSTRACT .....	81
3.4 INTRODUCTION .....	82
3.5 MATERIALS AND METHODS .....	86

3.5.1 Biological Materials .....	86
3.5.2 Cultures.....	87
3.5.3 BCECF-AM Dye Loading.....	88
3.5.4 Excitation Lights and Photometric Analysis .....	89
3.5.5 Image Analysis .....	91
3.5.6 Ratiometric Signal Calibration .....	91
3.6 RESULTS.....	93
3.6.1 Typical Apical Cytosolic pH Profile .....	93
3.6.2 Microfluorometric Method Validation .....	98
3.6.2.1 Effect of Dye Concentration.....	98
3.6.2.2 Ratiometric Signal Relationship with Actual pH .....	100
3.6.2.3 Effect of Extracellular pH.....	102
3.6.2.4 AM Fungi Cytosolic pH and Different Physiological States .....	105
3.7 DISCUSSION.....	107
3.7.1 Assessment of the Method.....	107
3.7.2 Characteristic pH Profile .....	109
3.7.3 Cytosolic pH is Physiological State Dependent .....	111
3.8 ACKNOWLEDGMENTS .....	114
3.9 LITERATURE CITED.....	114



**CHAPITRE IV : REGULATION OF MYCORRHIZAL SYMBIOSIS:  
DEVELOPMENT OF A NUTRITIONAL MODEL.....121**

**MANUSCRIT #3 : REGULATION OF MYCORRHIZAL SYMBIOSIS:  
DEVELOPMENT OF A NUTRITIONAL MODEL.....123**

4.1 FINANCIAL SUPPORT .....	123
4.2 ABSTRACT .....	124
4.3 INTRODUCTION .....	125
4.4 MATERIALS AND METHODS .....	128
4.4.1 Biological Material .....	128
4.4.2 Experimental liquid Cultures.....	129
4.4.3 Analytical.....	131
4.4.3.1 Sampling and Harvesting.....	131
4.4.3.2 Production of AM Fungi Propagule .....	131
4.4.3.3 Extracellular Nutrient Analysis .....	132
4.4.3.4 Intracellular Nutrient Analysis .....	133
4.4.3.5 Elementary Analysis.....	133
4.4.3.6 Glomus intraradices Extraradical Network Specific Mass.....	134
4.4.3.7 Dual Model Simulations .....	135
4.4.3.8 Kinetic Parameters Calculation .....	135
4.5 RESULTS AND DISCUSSION.....	136

4.5.1 Effect of Initial Phosphate Concentration on non-mycorrhizal Root Growth and Nutrition .....	136
4.5.2 Effect of mycorrhizal Colonization on Roots Growth and Symbiont Nutrition .....	145
4.5.3 The Growth Dual Model Development.....	148
4.5.3.1 Hypotheses for Model Development.....	149
4.5.3.2 Dual Model Assumptions .....	149
4.5.3.3 Biokinetic Dual Model Description.....	151
4.5.4 Growth Model Calibration and Behaviour .....	157
4.5.4.1 Simulation of Hairy Roots Growth.....	157
4.5.4.2 Simulation of AM fungus and Hairy Roots Growth.....	163
4.6 CONCLUSIONS .....	169
4.6.1 Growth Dual Model Development .....	169
4.6.2 Pi Intracellular Pools: a Key Parameter in Symbiosis Regulation .....	170
4.6.3 Host Root Intracellular Sugars: AM Fungus is a Competitor .....	171
4.7 NOMENCLATURE .....	171
4.8 ACKNOWLEDGEMENTS.....	178
4.9 REFERENCES .....	178

**CHAPITRE V : PRODUCTION EN BIORÉACTEUR DE PROPAGULES DU  
CHAMPIGNON ENDOMYCORHIZIEN *G. INTRARADICES* EN CULTURE  
SYMBIOTIQUE SUR DES RACINES DE CAROTTE TRANSFORMÉES.....191**

5.1 INTRODUCTION .....	191
5.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	201
5.2.1 Le matériel biologique .....	201
5.2.2 Les cultures en bioréacteurs .....	201
5.2.3 Analytique .....	202
5.2.3.1 Échantillonnage et récolte des systèmes de culture .....	202
5.2.3.2 Évaluation de la croissance intraracinaire du champignon endomycorhizien .....	202
5.2.3.3 Sélection et études d'une matrice-support .....	203
5.2.3.4 Évaluation de la croissance extraracinaire du champignon endomycorhizien .....	210
5.2.3.5 Analyse des nutriments extracellulaires .....	213
5.3 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....	214
5.3.1 Étude du comportement des symbiotes en bioréacteur alimenté en mode brouillard .....	214
5.3.1.1 Aspect général des cultures .....	214
5.3.1.2 Étude de l'effet de la quantité d'inoculum sur la performance des cultures .....	216
5.3.1.3 Comportement biocinétique des symbiotes .....	218

5.3.1.4 Évolution de la symbiose.....	223
5.3.2 Optimisation de la configuration du bioréacteur opéré en mode brouillard.....	226
5.3.2.1 Étude visant l'augmentation de la masse racinaire: le lieu de formation des vésicules .....	226
5.3.3 Étude de la compartimentation des symbiotes en culture en bioréacteur brouillard .....	231
5.3.3.1 Modification de la configuration du bioréacteur .....	231
5.3.3.2 Étude de performance de la culture compartimentée en bioréacteur opéré en mode brouillard .....	233
5.4 CONCLUSION .....	246
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>250</b>
<b>RECOMMANDATIONS .....</b>	<b>258</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>261</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>291</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1</b>	Comparaison de la composition de la sève dans les tissus vasculaires du lupin blanc.....	10
<b>Table 2.1</b>	<i>Daucus carota</i> mycorrhized hairy roots growth for liquid M medium Petri dish cultures.....	55
<b>Table 2.2</b>	<i>Glomus intraradices</i> propagules production process performances.....	60
<b>Table 4.1</b>	Elementary Analysis .....	144
<b>Table 4.2</b>	Kinetic Parameters .....	159
<b>Table 4.3</b>	<i>Daucus carota</i> Intracellular Concentrations .....	160
<b>Tableau 5.1</b>	Matériaux des supports de culture présélectionnés.....	205
<b>Tableau 5.2</b>	Composition élémentaire de la perlite .....	209
<b>Tableau 5.3</b>	Données de cultures en bioréacteur opéré en mode brouillard.....	222
<b>Tableau 5.4</b>	Performances comparées en bioréacteurs gazo-siphon et brouillard en milieu M liquide .....	224
<b>Tableau 5.5</b>	Essais effectués avec un lit de perlite .....	234

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1</b>	Les étapes de développement d'une plante .....	2
<b>Figure 1.2</b>	Morphologie et croissance des cellules d'une racine .....	5
<b>Figure 1.3</b>	Vue de coupe d'une racine .....	8
<b>Figure 1.4</b>	Cycle nutritionnel des plantes vasculaires. Tiré de Salisbury et Ross (1992). p. 160. ....	11
<b>Figure 1.5</b>	Types de transports transmembranaires. Tiré de Salisbury et Ross (1992). p.159. ....	12
<b>Figure 1.6</b>	Développement du champignon endomycorhizien. A. Réseaux mycélien et racinaire. B, Réseau mycélien intraracinaire. ....	18
<b>Figure 1.7</b>	Classification des endosymbiotes (Morton et Benny, 1990).....	19
<b>Figure 2.1</b>	Airlift bioreactor configuration .....	49
<b>Figure 2.2</b>	Dual culture performances of <i>Daucus carota</i> hairy roots mycorrhized with <i>Glomus intraradices</i> in liquid M medium in Petri	

dish. A, Mycorrhized *Daucus carota* hairy root growth, shown as growth index (harvested dry mass/inoculated dry mass). B, Normalized spore productions: in spores•g<sup>-1</sup> DW of inoculum•L<sup>-1</sup> medium. Cultures for inocula of 0.60±0.11 g DW•L<sup>-1</sup> medium. Error bars are standard deviations. ....54

**Figure 2.3** Nutrient consumption in Petri dish liquid cultures for an inoculum of 0.60±0.11 g DW•L<sup>-1</sup> medium. A, Major ions. ■, Nitrate. ○, Potassium. ▲, Phosphate. B, Carbohydrates. □, Fructose. ●, Glucose. Δ, Sucrose. Each point is the average of three cultures. Error bars are standard deviations. ....57

**Figure 2.4** Effect of inoculating conditions on symbiont growth in submerged cultures. A, Mycorrhized *Daucus carota* hairy root growth index (as described in Figure 2.2). B, Normalized spore production (as described in Figure 2.2). C, Actual spore production per culture volume. □, Petri dish cultures. ▲, Airlift bioreactor cultures. ....61

**Figure 3.1** Intracellular pH distribution within a growing germ tube of *Gigaspora margarita* loaded with the pH indicator BCECF and measured by fluorescence ratio imaging. A, Fluorescence image at 450 nm excitation. B, Same fluorescence image at 490 nm

excitation. C, Ratio of the two previous images (490/450 nm) as a pseudocolor image showing the pH variations along the hypha. D, Same ratio image representing the average pixel values along the length of the hypha; these values are proportional to pH values. ....94

**Figure 3.2** Senescing *Gigaspora margarita* germ tube three hours after BCECF-AM loading in high (lethal) DMSO condition. A, BCECF fluorescence microscopy (450 nm excitation). B, Same hypha obtained by Differential Interference Contrast microscopy. The fluorescence localizes in cytoplasmic area not yet necrosed (arrow). Bar =10  $\mu$ m. ....95

**Figure 3.3** *Gigaspora margarita* germ tubes. A, Image obtained by Differential Interference Contrast microscopy, bar = 10  $\mu$ m. A group of unidentified organelles is indicated (\*). B, Typical pH profile along the hyphal trunk: dotted lines show corresponding selected photometric reading windows for measurement of the fluorescence emitted by the pH indicator BCECF. ....96

**Figure 3.4** BCECF-AM loading conditions. Fluorescence ratios at 490 and 450 nm excitations of BCECF at varying pH for the following BCECF acid concentrations: 0.01  $\mu$ M (●), 0.04  $\mu$ M (○), 0.16  $\mu$ M



(■), and 0.63  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  with the same symbol (□). .....99

**Figure 3.5** Fluorescence signal calibration. A, pH calibration curves: in vitro calibration showing measurements of fluorescence ratios (for 490 and 450 nm excitations) of 1  $\mu\text{M}$  BCECF in sodium phosphate buffer at various pH (—), in vivo calibration showing the same fluorescence ratios measured in *Gigaspora margarita* germ tubes (—) (experimental mean values (n=4 to 6): ○, with corresponding standard error bars) at varying external pH in the presence of 1  $\mu\text{M}$  BCECF-AM, 90  $\mu\text{M}$  KCl and 4.4  $\mu\text{M}$  nigericin. Both calibration curves were calculated under polynomial fitting (order 4) from measured data ratios. B, Real time cell reaction (25  $\mu\text{m}$  from the hyphal tip) of *G. margarita* loaded with BCECF to nigericin/ $\text{K}^+$  addition after 300 s (↑) at external pH 5. The fluorescence ratios (right y-axis) for 490 nm/450 nm excitations and total fluorescence (left y-axis) at 450 nm excitation are given. Horizontal arrows (⇐, ⇒) indicate the corresponding axis of the two curves. ....101

**Figure 3.6** Loading kinetics of *Gigaspora margarita* (A) and *Glomus intraradices* (B) germ tubes with BCECF-AM at the tip (2  $\mu\text{m}$ ) and 9.5  $\mu\text{m}$  behind: cytosolic pH (▲), total fluorescence at 450 nm excitation (□). *G. intraradices* cytosolic pH values are

estimations using the calibration relationship established with *G. margarita*. .....103

**Figure 3.7** Effect of external pH on cytosolic pH of *Gigaspora margarita* germ tube (tip), measured 4 days after spore germination (n=10). The external pH were adjusted (5 mM sodium phosphate buffer) prior to spore inoculation. Error bars are 95% confidence intervals (SE). .....104

**Figure 3.8** Cytosolic pH ( $\text{pH}_c$ ) profile in hyphae of *Gigaspora margarita* and *Glomus intraradices* vs. different culture conditions. A, For *G. margarita*: in juvenile germ tubes defined as hyphae shorter than one spore diameter (n=8) (■) and in several cm long germ tubes growing in the absence (n=9) (○) or in the presence (Δ) of a *Daucus carota* hairy root (n=12). B, A magnification of the same curves for the first 20 μm. C, For *G. intraradices*: in germ tubes (n=3) (○) and in extraradical hyphal growing from a mycorrhizal *D. carota* hairy root laid directly on the solid medium (n=10) (■) or laid first on a filter paper (n=7) (Δ). D, A magnification of the same curves for the first had a pH of  $5.9 \pm 0.2$  at the tip (0-2 μm),  $6.4 \pm 0.4$  behind the tip (9.5 μm) and a plateau of 20 μm. *G. intraradices* cytosolic pH values are estimations using the

calibration relationship established with *G. margarita*. Error bars are 95% confidence intervals (SE).....106

**Figure 4.1** Non-mycorrhizal and mycorrhizal *D. carota* hairy roots with the AM fungus *Glomus intraradices* grown at different initial  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentrations in liquid cultures in Petri dish. Non-mycorrhizal hairy roots with hollow symbols and mycorrhizal roots with solid symbols. A, Hairy root growth: Initial Pi concentration of 0.02 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :  $\square$ ,  $\blacksquare$ . Initial Pi concentration of 0.12 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :  $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ . Growth model estimations: non-mycorrhizal at 0.02 mM Pi (— · —), 0.12 mM Pi (.....), mycorrhizal at 0.02 mM Pi (- - -) and at 0.12 mM Pi (\_\_\_\_\_). B, Hairy root growth: Initial Pi concentration of 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Growth model estimations: non-mycorrhizal (.....), mycorrhizal (\_\_\_\_\_). C, *Glomus intraradices* spore production at initial Pi concentration of 0.02 mM Pi ( $\blacksquare$ ) and 0.12 mM Pi ( $\blacktriangle$ ). Growth model estimations: 0.02 mM Pi (- - -) and 0.12 mM Pi (\_\_\_\_\_). D, *Glomus intraradices* spore production at initial Pi concentration of 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Growth model estimation: (\_\_\_\_\_). (n=5). Error bars are standard deviations.....137

**Figure 4.2** Specific growth rate response of *D. carota* hairy roots and AM fungi *Glomus intraradices* to different initial  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentrations in liquid cultures in Petri dish. Non-mycorrhizal hairy roots with hollow symbols and mycorrhizal roots with solid symbols. A, Hairy root specific growth rate (DW). B, *Glomus intraradices* specific spore production rate (spore number per dish). Growth model estimations: non-mycorrhizal (.....) and mycorrhizal (\_\_\_\_\_). (n=5). Error bars are 95% confidence intervals (SE).....138

**Figure 4.3** Nitrate and Pi concentration in the culture medium during liquid cultures. Non-mycorrhizal hairy roots with hollow symbols and mycorrhizal roots with solid symbols. A and B, 1 mM initial Pi. C and D, 0.12 mM initial Pi. E and F, 0.02 mM initial Pi. G, Magnification of the same curves as (F) for the first 15 d. Growth model estimations: non-mycorrhizal (.....) and mycorrhizal (\_\_\_\_\_). (n=5). Error bars are standard deviations. ....140

**Figure 4.4** Sugars concentration in the culture medium during liquid cultures. A and B, 1 mM initial Pi. C and D, 0.12 mM initial Pi. E and F, 0.02 mM initial Pi. G, Magnification of the same curves as (F) for the first 50 d. Mycorrhizal roots (A,C,E). Non-mycorrhizal roots

(B,D,F,G). Sucrose ( $\Delta$ ), Glucose ( $\bullet$ ), Fructose ( $\square$ ). (n=5). Error bars are standard deviations. .... 142

**Figure 4.5** Non-mycorrhizal and mycorrhizal hairy root yields. A, Inorganic phosphate. B, Nitrogen. C, Potassium. D, Total sugars. Non-mycorrhizal hairy roots with hollow symbols and mycorrhizal roots with solid symbols. (n=5). Elementary analysis (.....). Error bars are 95% confidence intervals (SE). .... 143

**Figure 4.6** The Hofstee plot of the relationship between Pi concentration and uptake rate for non-mycorrhizal hairy roots (hollow symbols) and mycorrhizal roots (solid symbols). High affinity uptake system: *D. carota* hairy roots estimated by the model (- - - -) and *Glomus intraradices* fungus (\_\_\_\_). .... 162

**Figure 4.7** Estimation of the translocation behaviour between the AM fungus and *D. carota* hairy root. A, Inorganic phosphate translocation from the AM fungus to the hairy root. B, Soluble sugars uptake by the AM fungus in the root. 0.02 mM Pi (. . . .), 0.04 mM Pi (— · —), 0.12 mM Pi (\_\_\_\_), 1 mM Pi (- - - - -). .... 166

**Figure 4.8** Evolution of the estimated specific growth rate of hairy roots. A, Roots estimated cytosolic Pi concentration. B, Roots estimated

intracellular sugars concentration. C, Culture media nitrate concentration. D, Roots specific growth rate. 0.02 mM Pi non-mycorrhizal (— · —) and mycorrhizal (- - - -), 0.12 mM Pi non-mycorrhizal (.....) and mycorrhizal (\_\_\_\_\_). ..... 167

**Figure 5.1** Apex d'hyphe extraracinaire du champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*. A, Culture symbiotique sur racine de carotte en boîte de Pétri gélifié tel que décrit au Chapitre 4. Diamètre moyen de 4 µm, vitesse de croissance moyenne de 2 µm/min. B, Culture symbiotique sur racine de carotte inoculée sur une membrane de papier en boîte de Pétri gélifié tel que décrit au Chapitre 4. Diamètre moyen de 8,5 µm, vitesse de croissance moyenne de 4,6 µm/min. Observations microscopiques à 63x. Barre = 10 µm. .... 194

**Figure 5.2** Relation entre l'aire de contact des racines mycorhizées avec le milieu nutritif et la colonisation racinaire. La colonisation racinaire correspond au pourcentage d'unités de longueur de racine contenant au moins une vésicule. L'aire de contact de 100% correspond aux cultures en milieu liquide (selon les données des Chapitres 2 et 4), de 50% (estimé) aux cultures sur milieu gélosé (Gaudette, 1997) et de 10% (estimé) aux cultures sur gel-papier

(Fortin et al., 1996; Gaudette, 1997). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95% (erreur standard). .....197

**Figure 5.3** Configuration du bioréacteur opéré en mode brouillard .....200

**Figure 5.4** Effet de la fragmentation des grains de perlite sur l'évaluation de la production de spores. Ordonnée de droite : Pourcentage de grains de perlite où s'est développé au moins un hyphes dans le milieu M gélosé (0,4% phytigel) après trois semaines en boîte de Pétri à la noirceur, à 26°C et 2% CO<sub>2</sub> (barres pleines). Ordonnée de gauche : Facteur d'amélioration de l'estimé du nombre de spores produites dans la perlite suite au fractionnement : (nombre de grains présentant la croissance d'hyphes)/(nombre de grains non-fractionnés présentant la croissance d'hyphes) (barres vides). .....212

**Figure 5.5** Bioréacteurs brouillard et gazo-siphon en culture.....215

**Figure 5.6** Effet de la quantité d'inoculum. A, Indice de l'accroissement de la masse racinaire en g DW de racines mycorhizées récoltées  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW de racines mycorhizées inoculées. B, Production normalisée de spores de *G. intraradices* en spores  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW de racines mycorhizées inoculées  $\bullet$  L<sup>-1</sup> de milieu de culture. C, Production de

spores de *G. intraradices* par culture. Cultures en bioréacteur opéré en mode brouillard avec 250 mL de milieu M (●), et en bioréacteur gazo-siphon avec 500 mL de milieu M (Δ).....217

**Figure 5.7** Performances comparées de cultures en bioréacteur brouillard et en boîtes de Pétri en milieu M liquide. A, Suivi de la croissance des racines en g DW de racines mycorhizées récoltées • g<sup>-1</sup> DW de racines mycorhizées inoculées. Cultures en bioréacteur opéré en mode brouillard avec 250 mL de milieu M et un inoculum de  $1 \pm 0,2$  g WW (●), et en boîtes de Pétri avec 20 mL de milieu M et un inoculum de  $0,12 \pm 0,2$  g WW (□). B, Production de spores de *G. intraradices* par culture. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.....220

**Figure 5.8** Suivi des ions et glucides consommés pour une culture de racines mycorhizées en bioréacteur opéré en mode brouillard en milieu M liquide et un inoculum de  $1 \pm 0,2$  g WW. A, Ions : Pi (▲); K(○); NO<sub>3</sub> (■). B, Glucides : Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. ....221

**Figure 5.9** Performances du bioréacteur opéré en mode brouillard. A, Nombre de spores produites par bioréacteur. B, Nombre de spores produites



par masse sèche de racines récoltées. C, Indice d'accroissement de la masse racinaire :  $\text{g sec récoltés} \bullet \text{g}^{-1} \text{ sec inoculés}$ . Pour des temps de culture de 150 d (M), 90 d (M3P), 130 d (MW2 et MW2-M3P).et des inocula de  $1 \pm 0,2 \text{ g WW}$  par bioréacteur sauf pour M3P avec 1,5 g WW.  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.....228

**Figure 5.10** Configuration du bioréacteur compartimenté opéré en mode brouillard. ....232

**Figure 5.11** Production de propagules en bioréacteur de 1 L opéré en mode brouillard compartimenté. A, Productions de propagules totales : spores libres + spores dans la perlite + vésicules. B, Rendement en propagules totales : propagules produites / g DW racines produites. C, Indice de croissance des racines : g DW récoltés / g DW inoculés. M,  $n=3$ ; M3P,  $n=3$ ; MW2,  $n=3$ ; MW2-M3P,  $n=3$ ; Perlite (1),  $n=4$ ; Perlite (2),  $n=2$ ; Perlite (3),  $n=2$ ; Perlite (4),  $n=4$ ; Perlite (5),  $n=2$ . Perlite (#) se réfère au Tableau 5.5. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. ....236

**Figure 5.12** Distribution de la production de propagules en bioréacteur opéré en mode brouillard compartimenté. A, Productions de spores présentes avec les racines mycorhizées. B, Production de grains de

perlite contenant au moins une spore. C, Production de vésicules. M, n=3; M3P, n=3; MW2, n=3; MW2-M3P, n=3; Perlite (1), n=4; Perlite (2), n=2; Perlite (3), n=2; Perlite (4), n=4; Perlite (5), n=2. Perlite (#) se réfère au Tableau 5.5. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. ....237

**Figure 5.13** Développement intraracinaire du champignon en bioréacteur opéré en mode brouillard compartimenté. A, Colonisation racinaire : nombre de sections de racines de 2 mm contenant au moins une vésicule sur la longueur racinaire totale. B, Densité de colonisation : nombre moyen de vésicules par section de 2 mm en contenant au moins une. M, n=3; M3P, n=3; MW2, n=3; MW2-M3P, n=3; Perlite (1), n=4; Perlite (2), n=2; Perlite (3), n=2; Perlite (4), n=4; Perlite (5), n=2. Perlite (#) se réfère au Tableau 5.5. Observations sommaires des vésicules (.....). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.....238

**Figure C.1** Suivi de la consommation des principaux éléments des milieux de culture MW2 et M3P en bioréacteur opéré en mode brouillard en deux étapes. A, Ions : Cl (▲); Ca(○); SO<sub>4</sub> (■); Mg (□). B, Ions : Pi (▲); K(○); NO<sub>3</sub> (■). C, Glucides : Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P

(.....). Un inoculum de  $1 \pm 0,2$  g WW par bioréacteur.  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. ....307

**Figure C.2** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture MW2 en bioréacteur opéré en mode brouillard. A., Ions : Cl ( $\square$ ); Mg( $\circ$ );  $\text{SO}_4$  ( $\blacksquare$ ). B., Ions : Pi ( $\blacktriangle$ ); K( $\circ$ );  $\text{NO}_3$  ( $\blacksquare$ ). C., Glucides : Saccharose ( $\Delta$ ); Glucose ( $\bullet$ ); Fructose ( $\square$ ). Un inoculum de  $1 \pm 0,2$  g WW par bioréacteur.  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. ....308

**Figure C.3** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture M3P en bioréacteur opéré en mode brouillard. A., Ions : Pi ( $\blacktriangle$ ); K( $\circ$ );  $\text{NO}_3$  ( $\blacksquare$ ). B., Glucides : Saccharose ( $\Delta$ ); Glucose ( $\bullet$ ); Fructose ( $\square$ ). Un inoculum de  $1.5 \pm 0,2$  g WW par bioréacteur.  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. ....309

**Figure C.4** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur opéré en mode brouillard en 2 étapes munis d'un lit de perlite non-fractionnée et rincée à l'eau distillée. A, Pi ( $\blacktriangle$ ); K( $\circ$ );  $\text{NO}_3$  ( $\blacksquare$ ). B, Na ( $\square$ ); Mg ( $\blacksquare$ ). C, Saccharose ( $\Delta$ ); Glucose ( $\bullet$ ); Fructose ( $\square$ ). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (.....).  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à

l'écart type. ....310

**Figure C.5** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur munis d'un lit de perlite non-fractionnée, rincée à l'eau distillée et opéré en mode brouillard à la 1<sup>ière</sup> étape, puis, le milieu liquide a été retiré tout en maintenant l'alimentation des gaz. A, Pi (▲); K(○); NO<sub>3</sub> (■). B, Ca (□); Mg (■). C, Na (□); D, Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (.....). n=3. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. ....311

**Figure C.6** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur munis d'un lit de perlite fractionnée à 0,595 mm, non-rincée à l'eau distillée et opéré en mode brouillard en deux étapes. A, Pi (▲); K(○); NO<sub>3</sub> (■). B, Na (□); C, Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (.....). n=3. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. ....312

**Figure C.7** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur munis d'un lit de perlite fractionnée à 0,595 mm, rincée dans une solution aqueuse à 5 mM KNO<sub>3</sub> et opéré en mode brouillard à la 1<sup>ière</sup> étape, puis, le milieu liquide a été retiré

tout en maintenant l'alimentation des gaz. A, Pi ( $\blacktriangle$ ); K( $\circ$ ); NO<sub>3</sub> ( $\blacksquare$ ). B, Cl ( $\square$ ); Mg ( $\blacksquare$ ). C, Na ( $\square$ ); D, Saccharose ( $\Delta$ ); Glucose ( $\bullet$ ); Fructose ( $\square$ ). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (.....). n=3. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.....313

**Figure C.8** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur munis d'un lit de perlite non-fractionnée, rincée à l'eau distillée et opéré en mode brouillard en 3 étapes. A, Pi ( $\blacktriangle$ ); K( $\circ$ ); NO<sub>3</sub> ( $\blacksquare$ ). B, Na ( $\square$ ); C, Saccharose ( $\Delta$ ); Glucose ( $\bullet$ ); Fructose ( $\square$ ). Remplacement du milieu M3P pour MW2 (.....). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (- - -). n=3. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. ....314

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AM	champignon endomycorhizien à arbuscules ("arbuscular mycorrhizal")
BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(and-6)-carboxyfluorescein
BCECF-AM	acetoxymethyl ester de BCECF.
d	jour ("day")
DW	Masse sèche ("dry weight")
DWr	Facteur de conversion de la masse humide de racine en mL d'eau, ayant une valeur de 0.1 [g DW • g <sup>-1</sup> WW]
Evap	Taux d'évaporation du milieu liquide mesuré en boîte de Pétri, ayant une valeur de 7 mL en 120 jours de culture [mL • d <sup>-1</sup> ]
inhi	Indice de l'inhibition de la croissance d'un champignon AM associée à la concentration extracellulaire en phosphate inorganique
inhiPr	Indice de l'inhibition de la croissance des racines transformées associée à la concentration extracellulaire en phosphate inorganique

- $K_1$  Constante du taux de croissance des racines associée à la concentration intracellulaire en phosphate inorganique [g DW  $\bullet$  mmol<sup>-1</sup> Pi]
- $K_2$  Constante du taux de croissance des racines associée à la concentration intracellulaire en glucides [g DW  $\bullet$  g<sup>-1</sup> glucides]
- $K_3$  Constante du taux de croissance des racines associée à la concentration intracellulaire en nitrate [g DW  $\bullet$  mmol<sup>-1</sup> NO<sub>3</sub>]
- $K_{c,e,s}$  Constante du taux de croissance d'un champignon AM associée à la concentration intracellulaire en glucides [g DW  $\bullet$  g<sup>-1</sup> glucides ]
- $K_{c,e,p}$  Constante du taux de croissance d'un champignon AM associée à la concentration intracellulaire en phosphate [g DW  $\bullet$  mmol<sup>-1</sup> Pi]
- $K_{m,l}$  Constante de haute affinité [mmol  $\bullet$  L<sup>-1</sup> ]
- $K_{m,l,c,e}$  Constante de haute affinité du champignon endomycorhizien pour l'ion phosphate inorganique [mmol Pi  $\bullet$  L<sup>-1</sup> ]
- $K_{m,l}$  Constante de basse affinité [mmol  $\bullet$  L<sup>-1</sup> ]

$K_{m, ll, c, e}$	Constante de basse affinité du champignon endomycorhizien pour l'ion phosphate inorganique [mmol Pi • L <sup>-1</sup> ]
$K_{m, l, r}$	Constante de haute affinité de la racine transformée pour l'ion phosphate inorganique [mmol Pi • L <sup>-1</sup> ]
$K_{m, ll, r}$	Constante de basse affinité de la racine transformée pour l'ion phosphate inorganique [mmol Pi • L <sup>-1</sup> ]
$K_{m, l, c, S}$	Constante d'affinité du champignon endomycorhizien pour les glucides intraracinaires [g glucides • g DW <sup>-1</sup> ]
$K_{m, l, r, S}$	Constante d'affinité de la racine pour les glucides [g glucides • g DW <sup>-1</sup> ]
$K_p$	Constante d'inhibition de la croissance du champignon face à la concentration extracellulaire en phosphate inorganique [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$K_{pp}$	Constante d'inhibition de la croissance de la racine transformée face à la concentration extracellulaire en phosphate inorganique [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$m_r$	Maintenance sur le phosphate inorganique de la racine [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW • d <sup>-1</sup> ]



$m_{r, s}$	Maintenance sur les glucides inorganique de la racine [g glucides • g <sup>-1</sup> DW • d <sup>-1</sup> ]
MYC	Racines mycorhizées
ND	Non disponible
NM	Racines non-mycorhizées
$NO_3$	Concentration extracellulaire en nitrate [mmol NO <sub>3</sub> • L <sup>-1</sup> ]
$P_c$	Concentration totale en phosphate inorganique intracellulaire du champignon [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$P_{c, s}$	Concentration en phosphate inorganique intracellulaire stocké du champignon [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
pH <sub>c</sub>	pH cytosolique
Pi	Phosphate inorganique
$P_i$	Concentration extracellulaire en phosphate inorganique [mmol Pi • L <sup>-1</sup> ]
$P_{i, c}$	Concentration en phosphate inorganique intracellulaire libre du champignon [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]

$P_{i,c,max}$	Concentration maximale en phosphate inorganique intracellulaire libre du champignon [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$P_{i,r}$	Concentration en phosphate inorganique intracellulaire libre de la racine [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$P_{i,r,max}$	Concentration maximale en phosphate inorganique intracellulaire libre de la racine [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$P_r$	Concentration totale en phosphate inorganique intracellulaire de la racine [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$P_{r,crit}$	Concentration critique en phosphate inorganique intracellulaire total de la racine [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$P_{r,s}$	Concentration en phosphate inorganique intracellulaire stocké de la racine [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$q_{c,e}$	Taux spécifique de production de spores [d <sup>-1</sup> ]
$q_{c,e,max}$	Taux spécifique maximum de production de spores [d <sup>-1</sup> ]
$r_{hydro}$	Taux spécifique d'hydrolyse du saccharose par les racines transformées [g saccharose • g <sup>-1</sup> DW • d <sup>-1</sup> ]

$S$	Concentration extracellulaire totale en glucides [g glucides • L <sup>-1</sup> ]
$S_i$	Concentration extracellulaire en un substrat
$S_{c.crit}$	Concentration critique intracellulaire du champignon en glucides [g glucides • g <sup>-1</sup> DW]
$S_{i.c}$	Concentration intracellulaire du champignon en glucides [g glucides • g <sup>-1</sup> DW]
$S_{i.r}$	Concentration intracellulaire de la racine transformée en glucides [g glucides • g <sup>-1</sup> DW]
$S_{r.crit}$	Concentration critique intracellulaire de la racine transformée en glucides [g glucides • g <sup>-1</sup> DW]
Tr	Présent en concentrations traces
$V$	Volume de milieu liquide [L]
VAM	champignon endomycorhizien à arbuscules et à vésicules ("vesicular arbuscular mycorrhizal")

- $V_{max, I}$  Taux spécifique maximum à haute affinité de consommation d'un élément  
[mmol  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]
- $V_{max, I, c, e}$  Taux spécifique maximum de consommation du phosphate inorganique à haute affinité du champignon [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]
- $V_{max, II}$  Taux spécifique maximum à basse affinité de consommation d'un élément  
[mmol  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]
- $V_{max, II, c, e}$  Taux spécifique maximum de consommation du phosphate inorganique à basse affinité du champignon [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]
- $V_{max, i, c, r}$  Taux maximum de transfert de phosphate inorganique du champignon endomycorhizien aux cellules racinaires [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]
- $V_{max, I, r}$  Taux spécifique maximum de consommation du phosphate inorganique à haute affinité de la racine transformée [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]
- $V_{max, II, r}$  Taux spécifique maximum de consommation du phosphate inorganique à basse affinité de la racine transformée [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]
- $V_{max, I, r, S}$  Taux maximum de consommation de glucides par la racine transformée  
[g glucides  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]

$V_{max, S, c}$	Taux maximum de consommation de glucides par le champignon endomycorhizien dans les tissus de la racine transformée [g glucides • g <sup>-1</sup> DW • d <sup>-1</sup> ]
$W/D$	Ratio masse humide sur masse sèche [g WW • g <sup>-1</sup> DW]
WW	Masse humide ("wet weight")
$X_r$	Masse sèche racinaire [g DW]
$X_{c,e}$	Nombre de spores dans le réseau extraracinaire [# de spores]
$X_{c,e, DW}$	Masse du réseau extraracinaire du champignon endomycorhizien [g DW]
$Y_{N/c}$	Coefficient de rendement du champignon en azote [mmol N • g <sup>-1</sup> DW]
$Y_{N/r}$	Coefficient de rendement racinaire en azote [mmol N • g <sup>-1</sup> DW]
$Y_{P/c}$	Coefficient de rendement du champignon en phosphore [ mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]
$Y_{P/r}$	Coefficient de rendement racinaire en phosphore [mmol Pi • g <sup>-1</sup> DW]

$Y_{S/c}$  Coefficient de rendement du champignon en glucides  
[g glucides  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]

$Y_{S/r}$  Coefficient de rendement racinaire en glucides [g glucides  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]

$\mu_r$  Taux de croissance spécifique de la racine transformée [d<sup>-1</sup>]

$\mu_{r, \max}$  Taux maximum de croissance spécifique de la racine transformée [d<sup>-1</sup>]

## **LISTE DES ANNEXES**

**ANNEXE I : ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE VÉSICULES.....291**

**ANNEXE II : PROGRAMMES INFORMATIQUES DÉVELOPPÉS**

**ET UTILISÉS AU CHAPITRE 4.....293**

**B.1 Le programme d'appel : MINIP .....294**

**B.2 Le programme de minimisation : OKSMIN2.M.....295**

**B.3 Le programme contenant les équations différentielles : QUATRE21.M .....298**

**B.4 Le programme de résolution du système d'équations différentielles .....303**

**ANNEXE III : DONNÉES DU CHAPITRE 5 .....306**

## **CHAPITRE PREMIER**

### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Ce chapitre traite de la relation symbiotique endomycorhizienne dans son contexte et dans sa fonctionnalité. L'objet de recherche aborde la relation symbiotique d'abord selon l'angle de la plante, puis, selon l'angle du champignon endomycorhizien. La problématique de la production de propagules de champignons endomycorhiziens à grande échelle par un procédé aseptique de deuxième génération est ensuite posée. Finalement les objectifs de la thèse ainsi que son organisation sont présentés.

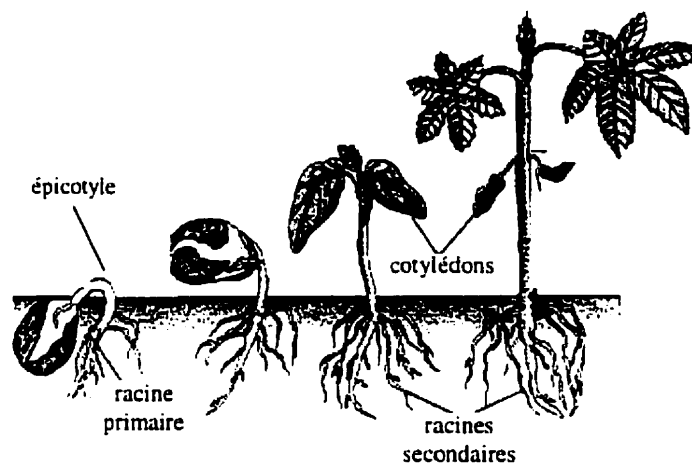
#### **1.1 L'OBJET DE RECHERCHE**

Les champignons endomycorhiziens sont des symbiotes obligatoires. Ils ne complètent leur cycle de vie qu'en association avec des racines de plantes. Bien que celles-ci ne soient pas strictement dépendantes de ces champignons, il n'en demeure pas moins qu'un nombre considérable de plantes profitent d'une relation symbiotique endomycorhizienne en milieu naturel. Les différents mécanismes de croissance de ces symbiotes ainsi que ceux impliqués dans l'initiation et le développement de la symbiose sont présentés dans cette section.



### 1.1.1 Les plantes vasculaires

Dès les toutes premières étapes de son développement (Figure 1.1), une plante se développera en fonction de sa capacité à tirer de son environnement les éléments essentiels à sa croissance. Lorsque les conditions environnementales lui sont favorables (humidité, température, etc.) la semence démarre le processus de germination. L'embryon, alors stimulé par un jeu précis d'hormones, poursuivra son développement.



**Figure 1.1** Les étapes de développement d'une plante

(Tiré de : Arms, K. et Camp, P.S. (1982) Plant Biology : dans Biology, Second Edition, CBS College Publishing New-York, É.-U., p.708)

L'épicotyle est la première structure végétale qui émerge de la semence, les cotylédons, les réserves nutritives, demeurant dans la semence. L'extrémité externe de l'épicotyle sera le pôle de développement du réseau racinaire. Par la suite, la tige et les premières feuilles seront formées. Jusqu'à cette étape, le carbone nécessaire à la construction des tissus ainsi qu'au fonctionnement énergétique de la jeune plante (plantule) proviendra principalement des réserves contenues dans les cotylédons. Les jeunes racines puiseront, pour leur part, les minéraux et l'eau nécessaires au développement des tissus de la plantule. Après la formation du feuillage secondaire, les cotylédons tomberont et la plante deviendra alors autotrophe en photosynthétisant ses glucides à partir du gaz carbonique de l'air. À partir de ce moment, un ensemble de facteurs externes tels le niveau d'ensoleillement, le taux de précipitation ainsi que la qualité du sol (structure, contenu en éléments nutritifs, microflore), détermineront les chances qu'aura la plante d'accomplir son cycle de vie (jusqu'à la formation de nouvelles semences). Tout au long de son développement, la plantule, puis la plante, sera soumise à divers stress : périodes de sécheresse, luminosité inadéquate, épuisement ou excès des éléments nutritifs du sol, agression par des agents pathogènes, etc.

#### *1.1.1.1 Le réseau racinaire*

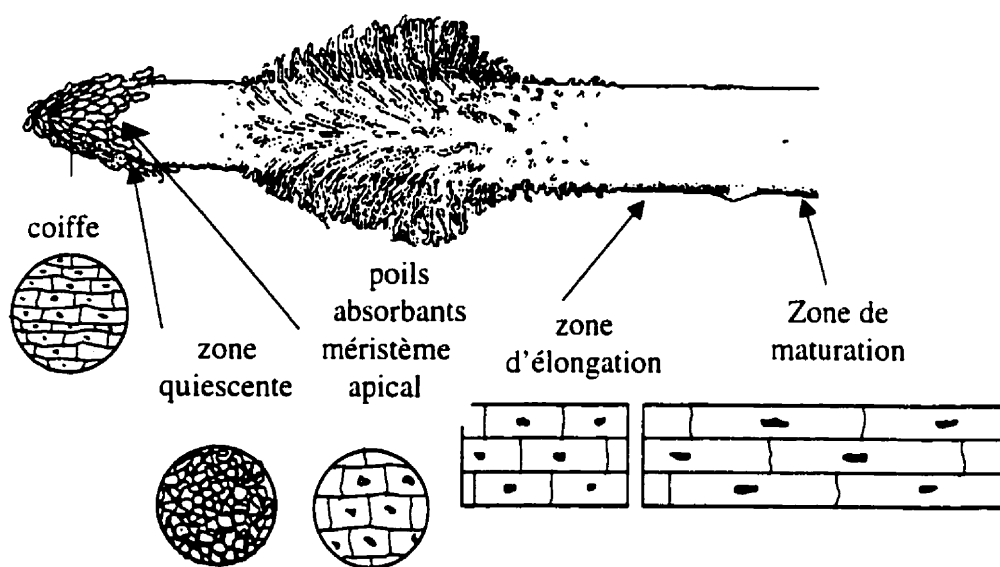
Cette section dresse l'état des connaissances sur les moyens dont disposent les plantes pour s'alimenter adéquatement.

Le réseau racinaire d'une plante cumule quatre fonctions principales :

- 1) ancrage de la plante au sol;
- 2) site principal de l'absorption de l'eau et des éléments minéraux essentiels à la croissance et la survie de la plante;
- 3) transport de l'eau et des éléments minéraux vers la partie aérienne de la plante;
- 4) site de stockage de différents éléments tels des glucides et autres éléments azotés et phosphatés pour la plante.

Pour explorer le sol, la racine se développe par croissance apicale (Figure 1.2). À l'apex, la coiffe apicale, formée d'un groupement de cellules particulières, protège le méristème qui pousse sur le sol et sécrète un liquide riche en polysaccharides, le mucigel, lubrifiant le glissement de la racine dans le sol. La zone quiescente, où peu de divisions cellulaires sont observées, devient active lorsque le méristème est endommagé. Le taux de division cellulaire maximal s'effectue au méristème apical où les cellules sont très peu vacuolisées (Bielecki et Ferguson, 1983). Alors que la zone

apicale progresse dans le sol, les cellules nouvellement formées sont alignées de façon déterminée dans le volume racinaire, arrêtent peu à peu de se diviser et s'allongent en se vacuolisant. Les cellules deviennent alors matures et différenciées.



**Figure 1.2** Morphologie et croissance des cellules d'une racine

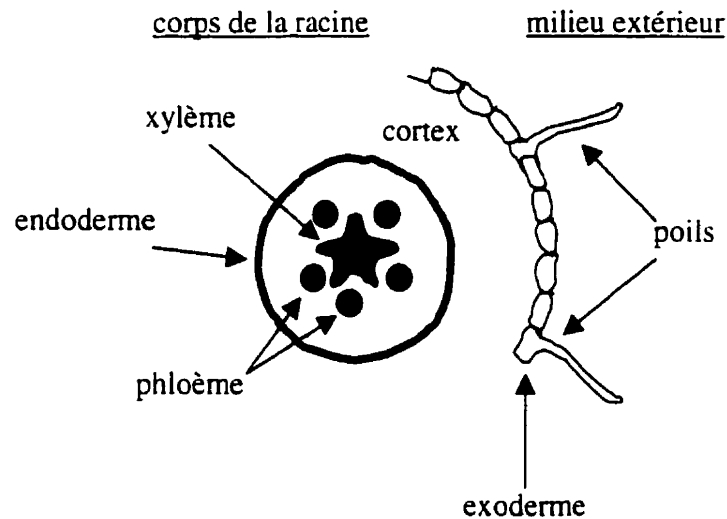
### *1.1.1.2 L'absorption des éléments nutritifs*

Le carbone essentiel à la construction de matériel cellulaire, et donc à la croissance d'une plante, est assimilé par les feuilles, lieu de la fabrication des glucides par photosynthèse à partir du gaz carbonique et de l'énergie de la lumière. Le reste des nutriments entrent généralement par les racines. Or, les sols agricoles sont souvent déficients en sources d'azote, de potassium et en phosphate inorganique (Pi) (Clarkson, 1985; Schachtman et al., 1998). Les sols fertiles peuvent ne contenir qu'environ 1  $\mu\text{M}$  de Pi disponible.

Une déficience en azote peut se traduire par une diminution du taux de croissance de la plante alors qu'une déficience en phosphate, en plus de diminuer la croissance, nuit à la maturation des fruits et des semences (Schachtman et al., 1998). Quant au potassium, une limitation de cet ion affectera toute la capacité d'assimilation des nutriments des racines par un déséquilibre du potentiel membranaire (Clarkson, 1980). Le cas du phosphate inorganique est particulier du fait que cet ion se retrouve principalement sous une forme complexée avec du fer ( $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ ) ou du calcium ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) dans des composés très peu solubles. La survie de la plante sera donc intimement liée à l'efficacité et au potentiel de son réseau racinaire à puiser du sol les éléments vitaux pour sa croissance.

Lorsque les cellules sont matures et différenciées, la racine est structurée telle qu'illustrée à la Figure 1.3. Certaines cellules de l'épiderme s'allongent pour former

des poils absorbants, augmentant ainsi l'ancrage et la surface de contact de la racine avec le sol. Plus profondément, on retrouve les cellules du cortex. Ces cellules ne forment pas un tissu étanche à l'écoulement de l'eau et des ions dans les espaces intercellulaires. Les cellules sont reliées entre elles par des plasmodesmes, des canaux formés lors de la division cellulaire et permettant des échanges cytoplasmiques contrôlés entre les cellules du cortex. Tout juste avant les tissus vascularisés on retrouve plusieurs assises cellulaires formant l'endoderme. Ces cellules sont soudées entre elles par un matériau, la subérine, rendant imperméables les espaces intercellulaires. Au centre on trouve les tissus vascularisés : le xylème et le phloème.



**Figure 1.3** Vue de coupe d'une racine

L'eau et les ions peuvent être acheminés aux tissus vasculaires selon deux modes : par la voie symplastique et apoplastique. Les ions empruntant la voie symplastique sont d'abord transportés à l'intérieur des cellules de l'exoderme. Les ions traversent les cellules via les plasmodesmes jusqu'aux tissus vasculaires. La voie apoplastique comprend les espaces intercellulaires de l'exoderme et du cortex. Il s'agit d'un écoulement par diffusion simple. Arrivés aux cellules de l'endoderme les ions sont transportés à l'intérieur des cellules puis, jusqu'aux vaisseaux du xylème. De la sève

circulant dans le xylème transporte les différents ions vitaux des racines vers la partie aérienne de la plante. La montée de la sève est maintenue par un effet de gradient de concentrations ainsi que par la transpiration des feuilles effectuée au niveau de leurs stomates. La sève concentrée en glucides photosynthétiques redescend vers les racines par les vaisseaux du phloème.

Par exemple, chez le lupin blanc (Tableau 1.1), une concentration en glucides de  $154 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  a été mesurée dans le phloème alors que la présence d'aucun glucide n'a été détectée dans le xylème (Pate, 1975, cité par Salisbury et Ross, 1992). En fait, seuls le nitrate (la source d'azote) et le phosphate sont plus concentrés dans le xylème que dans le phloème. De plus, le phosphate peut atteindre des concentrations jusqu'à 400 fois plus élevées dans la sève du xylème que dans le sol (Bieleski et Ferguson, 1983). Le phosphate est transloqué des racines aux feuilles (Clarkson et al., 1985), le lieu de la photosynthèse qui requiert 3 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) par molécule de  $\text{CO}_2$  fixée. L'ensemble de ce processus de circulation dans une plante est illustré à la Figure 1.4.

Que ce soit par un mode de transport ou un autre, les cellules racinaires de l'exoderme, de l'endoderme et du cortex sont donc en contact avec l'ensemble des nutriments du sol.



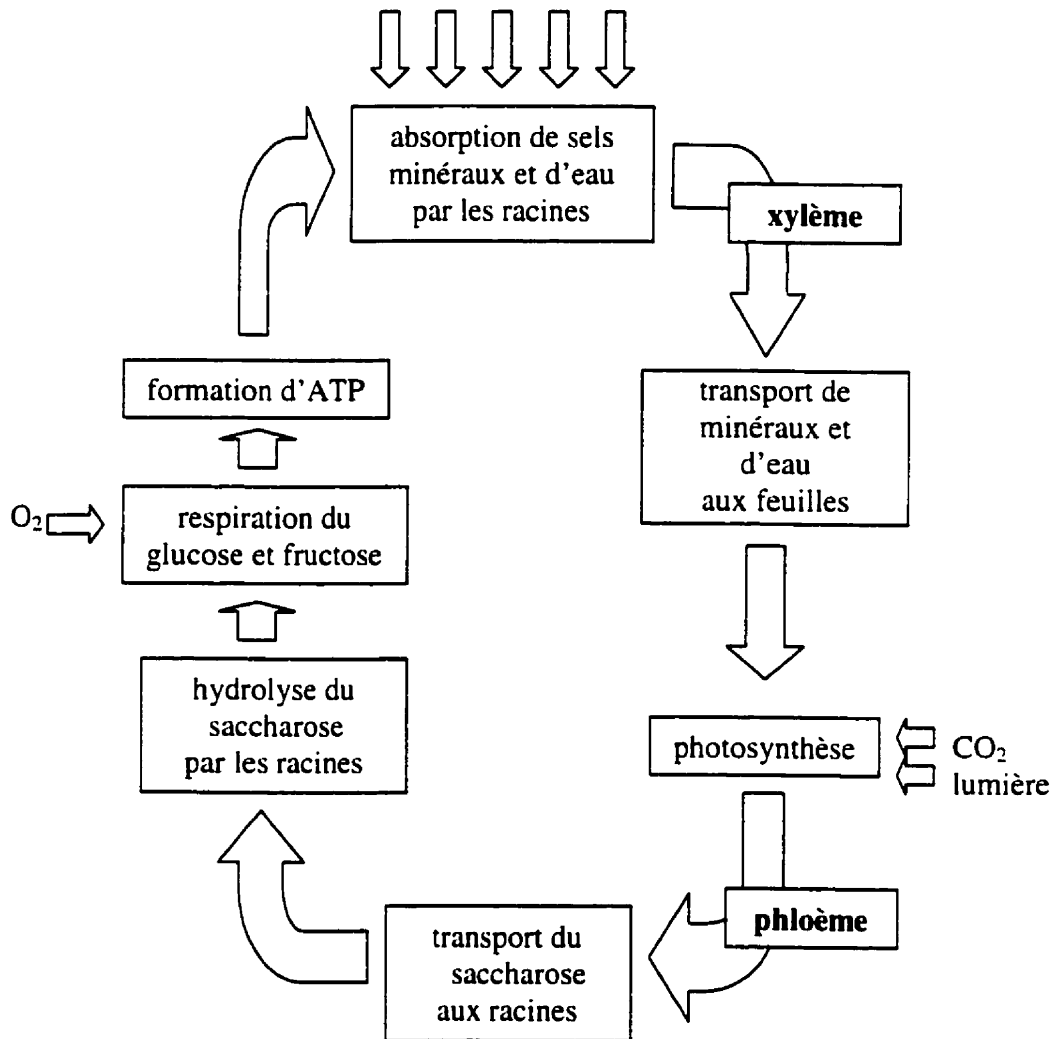
**Tableau 1.1** Comparaison de la composition de la sève dans les tissus vasculaires du  
lupin blanc

Élément	Xylème	Phloème
Saccharose	ND	154 g • L <sup>-1</sup>
Acides aminés	0,7 g • L <sup>-1</sup>	13 g • L <sup>-1</sup>
K	2,31 mM	39,39 mM
Na	2,61 mM	5,22 mM
Mg	1,11 mM	3,50 mM
Ca	0,43 mM	0,50 mM
Fe	0,032 mM	0,18 mM
Mn	0,011 mM	0,025 mM
Zn	0,0061 mM	11,27 mM
Cu	Tr	0,0061 mM
NO <sub>3</sub>	0,16 mM	ND
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM	ND
pH	6,3 mM	7,9 mM

Tiré de Salisbury et Ross, 1992 sauf pour H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, tiré de Bielecki (1973)

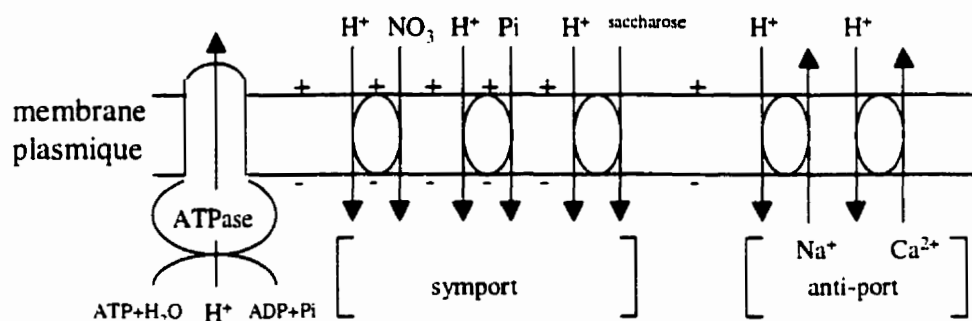
Tr : traces

ND : non-disponibles



**Figure 1.4** Cycle nutritionnel des plantes vasculaires. Tiré de Salisbury et Ross (1992). p. 160.

Sauf pour les molécules hautement hydrophobes, la membrane cytoplasmique est imperméable aux ions nécessaires à la croissance de la plante. Les types de transport dont les cellules racinaires disposent sont présentés à la Figure 1.5. Cette figure a été limitée aux éléments principaux consommés. Les glucides et les ions nitrate et phosphate sont co-transportés avec un ou plusieurs protons (selon l'élément). C'est grâce à l'activité des pompes ATPase et au maintien transmembranaire du gradient en protons qu'il peut y avoir transport (symport protons) des nutriments (Gout et al., 1992). En plus des protons, le transport sélectif d'autres ions contribue à maintenir le potentiel membranaire. Ce potentiel constitue la force motrice favorisant l'entrée des ions par co-transport en attirant les protons à l'intérieur des cellules.



**Figure 1.5** Types de transports transmembranaires. Tiré de Salisbury et Ross (1992).  
p.159.

Les ions potassium (en priorité) et sodium sont utilisés par les cellules pour maintenir l'électronégativité de la membrane cellulaire via des antiports et des canaux spécifiques dont l'ouverture est régulée avec le potentiel membranaire comme point de consigne.

Le système à co-transport peut être modélisé par un modèle de Michaelis-Menten à un ou deux niveaux (Lefebvre et Clarkson, 1983) selon la forme :

$$\frac{\partial S_i}{\partial t} = - \left[ V_{\max, I} \cdot \frac{S_i}{K_{m, I} + S_i} + V_{\max, II} \cdot \frac{S_i}{K_{m, II} + S_i} \right] \quad 1.1$$

Où  $S_i$  est la concentration extracellulaire en un substrat. L'indice I réfère à un système de transport à haute affinité et II à un système de transport à basse affinité pour l'élément en question. Les  $K_m$  sont les constantes d'affinité et  $V_{\max}$  le taux maximum de transport. Par exemple, certaines plantes telle la laitue, avec un  $K_{m, I}$  de 2  $\mu\text{M}$  Pi, présente une affinité supérieure face au phosphate que le blé avec 5,3  $\mu\text{M}$  Pi (Itoh et Barber, 1983).

### *1.1.1.3 Les adaptations aux stress environnementaux*

Au cours de leur évolution sur Terre (400 millions d'années) les plantes vasculaires ont développé plusieurs mécanismes d'adaptation pour survivre en conditions nutritionnelles limitantes (Grime, 1977). Ces adaptations peuvent être classées selon trois ordres : 1) morphologiques, 2) physiologiques et 3) symbiotiques. Par adaptations morphologiques on entend qu'en conditions de stress nutritionnel, certaines plantes augmentent le nombre de poils absorbants et/ou leur longueur (Clarkson, 1985), ou développent un nombre plus important de racines fines afin de maximiser la surface d'échange avec le sol ainsi que le volume exploré. Le lupin blanc développe des racines courtes appelées protéroïdes, très chevelues, qui augmentent la surface de sols exploré de trois ordres de grandeur (Gilbert et al., 1997). D'autres plantes effectuent des adaptations d'ordre physiologique. Elles augmentent leur affinité pour certains ions (tel pour le  $P_i$ ) en diminuant leur valeur de  $K_{m,I}$  (Toriani-Gorini, 1994) ou en augmentant leur  $V_{max,I}$  (Clarkson et al., 1978; Clarkson, 1985; Lee et Ratcliffe, 1990). D'autres encore exsudent des agents chélateurs ou des acides organiques afin d'accélérer la lixiviation du  $P_i$  et d'autres ions complexés sous des formes peu solubles (Clarkson, 1985). Le lupin blanc diminue sa consommation en phosphate inorganique en maximisant la fixation obscure du  $CO_2$ , requérant moins d'ATP que la voie de la photosynthèse. De plus, jusqu'à 66% du carbone fixé est incorporé en citrate et malate qui sont exsudés afin de favoriser la lixiviation du phosphate du sol (Gilbert et al., 1997). Il y a aussi le cas des plantes carnivores, dont

la *Drosera* est la plus commune au Québec, comblant leur carences par la digestion d'insectes (frère Marie-Victorin, 1964). Finalement, les adaptations les plus étudiées et suscitant beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique sont les associations symbiotiques avec des microorganismes de la rhizosphère.

En effet, des bactéries de la rhizosphère sont connues pour favoriser la croissance des plantes (PGPR : "plant growth promoting rhizo-bacteria", McInroy J.A. et Kloepper J.W., 1994, cité par Requena et al., 1997). D'autres, comme le *Rhizobium* (formant des nodules) et *Azotobacter* (non-nodulantes), sont connues pour fixer l'azote de l'air favorisant ainsi la nutrition azotée des plantes (Azcon et al., 1979).

Des champignons interviennent aussi dans l'amélioration de la nutrition des plantes. Tout d'abord les champignons ectomycorhiziens dont le plus connu est sans contredit la truffe, mais il y a aussi les cèpes et les chanterelles, appartiennent le plus souvent aux basidiomycètes et plus rarement aux ascomycètes. Ce type de champignon se développe dans le sol et autour des racines de plantes, pénètre presque toujours dans l'espace intercellulaire du cortex pour former le réseau de Hartig, sans toutefois traverser la paroi cellulaire. Ils s'associent à plus de 2000 espèces de plantes dont la plupart sont ligneuses et vivaces (Kendrick, 1985), tant parmi les gymnospermes tels le pin, l'épinette, le mélèze, que chez les angiospermes tels le chêne, le saule, etc.

Une autre classe (zygomycètes) de champignons forment des endomycorhizes à arbuscules. Une partie de leur réseau mycélien traverse la paroi des cellules racinaires

et devient intracellulaire (structure appelée arbuscule). Près de 80% des espèces de plantes vasculaires sont réceptives à l'établissement de symbioses avec ces champignons mycorhiziens d'autant plus si les sols sont pauvres en éléments nutritifs (Kendrick, 1985). Les plantes n'établissant pas de relations endomycorhiziennes sont : les Brassicaceae (ex. chou, moutarde), Commelinaceae, Cyperaceae (ex. papyrus), Juncaceae (ex. jonc), Proteaceae ainsi que certains membres des Capparaceae, Polygonaceae, Resedaceae, Urticaceae et les membres herbacés des Caryophyllales (Amaranthaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Portulacaceae) en plus de quelques unes des 2000 espèces de plantes ligneuses qui sont ectomycorhiziennes. Bien que la majorité des plantes formant des endomycorhizes sont connues, seulement un peu plus de 150 espèces de champignons endomycorhiziens ont été répertoriées (Rossman, 1993).

Les champignons mycorhiziens à arbuscules améliorent la structure du sol (Bethlenfalvay, 1992; Miller et Jastrow, 1992; Hamel, 1995), la nutrition phosphatée et peut-être azotée de leur plante-hôte (en plus du cuivre, du zinc, etc.) (Smith, 1980; Schachtman et al., 1998, et les références qui y sont citées) et semblent offrir une protection accrue face aux maladies des plantes (Dehne, 1982; St-Arnaud et al., 1994; 1996; 1997; Fillion, 1998). L'implication des champignons endomycorhiziens dans la résistance des plantes au stress hydrique (voire la sécheresse) a été démontrée dans certains cas (Hardie et Leyton, 1981) mais leur effet (positif, neutre ou négatif) semble être largement tributaire du champignon utilisé (Ruiz-Lozano et al., 1995). C'est une

association plante/champignon endomycorhizien qui suscite beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique pour les raisons citées ci-haut.

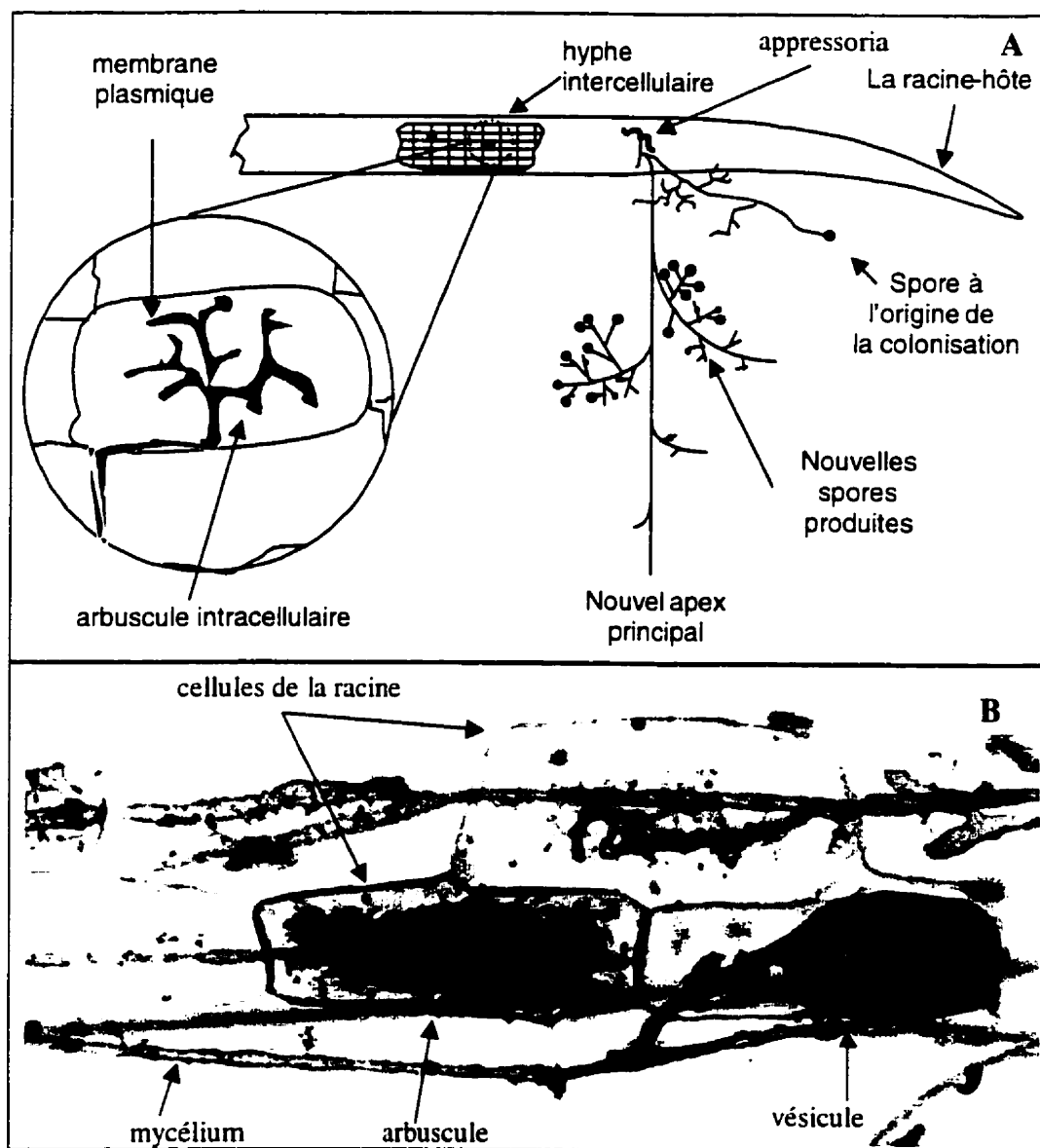
### **1.1.2 Le champignon mycorhizien à arbuscules: un symbiote obligatoire**

Les champignons mycorhiziens à arbuscules sont des symbiotes obligatoires; ils ne semblent pas compétents pour puiser le carbone nécessaire à leur croissance ailleurs que dans les tissus des plantes (Pfeffer et al., 1998, et les références qui y sont citées). L'apparition de ces organismes et des plantes vasculaires remonterait à l'époque dévonienne (Simon et al., 1993) et la présence de ce champignon a même été détectée dans des fossiles de plantes âgés de plus de 400 millions d'années (Taylor et al., 1995).

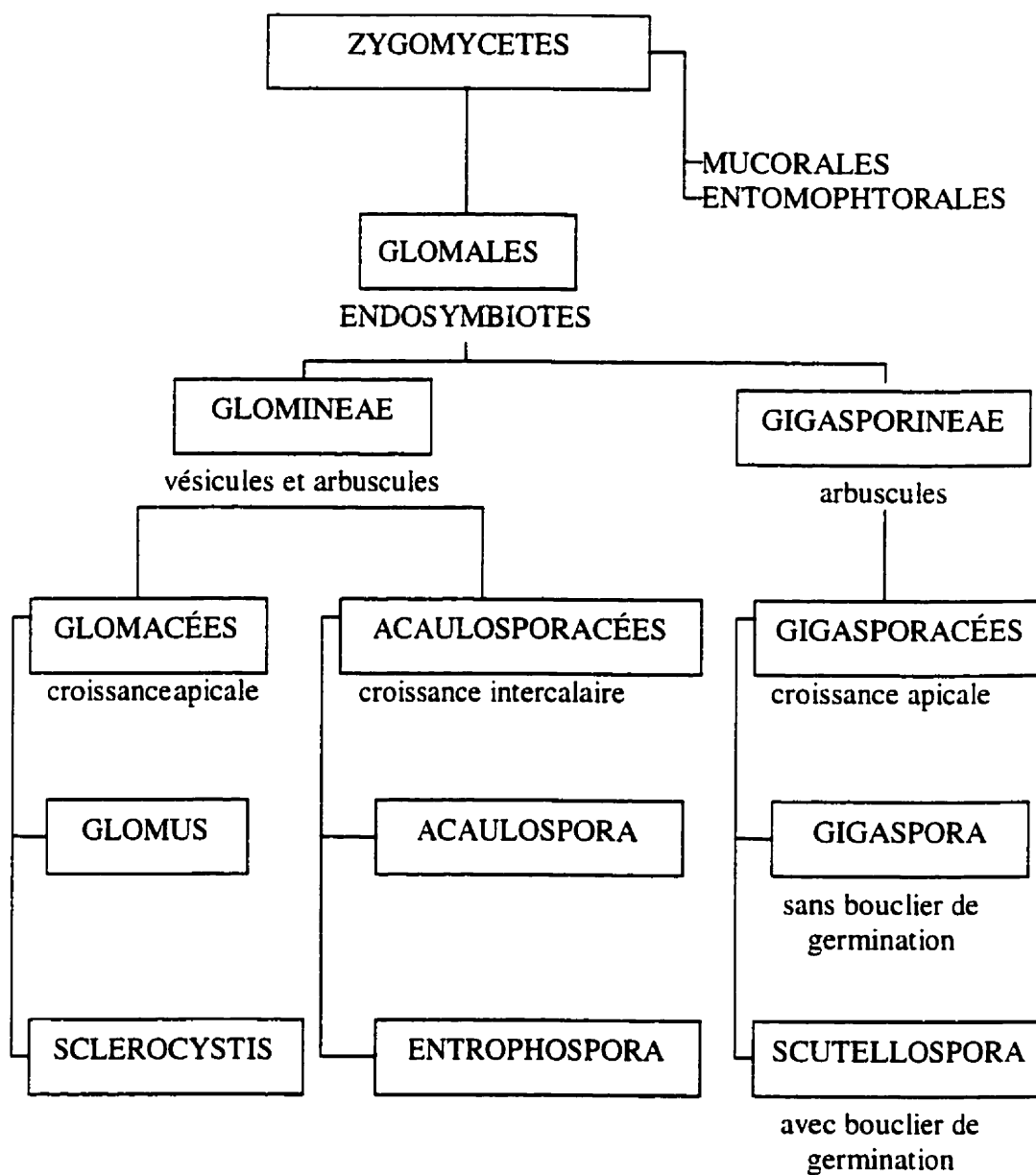
Ces champignons produisent de façon asexuée des organes de survie sous forme de spores ou, pour certaines espèces, aussi sous forme de vésicules (Figure 1.6). Ces deux types d'organes de survie contiennent des réserves lipidiques et des noyaux (Barber et al., 1998). Les spores se retrouvent annexées au réseau mycélien extraracinaire alors que les vésicules se forment à l'intérieur des racines. On appelle propagules ces organes de survie capables de régénérer le champignon.

Ces champignons font parti des Glomales (un ordre chez les Zygomycetes) qui se divisent en Glomineae et Gigasporineae (Figure 1.7). Les Glomineae regroupent les champignons mycorhiziens avec vésicules et arbuscules (VAM), et les Gigasporineae





**Figure 1.6** Développement du champignon endomycorhizien. A, Réseaux mycélien et racinaire. B, Réseau mycélien intraracinaire.



**Figure 1.7** Classification des endosymbiotes (Morton et Benny, 1990)

des champignons mycorhiziens à arbuscules (AM) (Morton et Benny, 1990, cité par Dalpé, 1995).

### 1.1.3 L'établissement d'une relation symbiotique

Durant leur longue histoire commune de relation mutualiste, les champignons mycorhiziens à arbuscules et les plantes ont développé une signalisation, aux niveaux cellulaire et moléculaire, complexe et subtile permettant aux deux organismes de se reconnaître et de coexister (Koide et Schreiner, 1992; Bonfante et Perotto, 1995). Tout d'abord, il doit y avoir compatibilité entre le champignon et la plante (Gianinazzi-Pearson, 1984). Une spore, une vésicule ou un hyphe, d'un réseau symbiotique établi, situé à proximité d'une racine de plante verra sa germination démarrer et/ou sa croissance être stimulée. Les exsudats racinaires bruts de plantes-hôtes (ex. : *Daucus carota*) induisent cet effet de stimulation de même que certaines molécules exsudées ou diffusant de la plante, tel que le CO<sub>2</sub> (Bécard et al., 1998).

Arrivé à la surface de la racine, l'hyphe forme de nouvelles structures spécifiques très ramifiées (Mosse et Hepper, 1975; Powell, 1976; Giovannetti et al., 1993b) induites par des molécules exsudées par la racine (Figure 1.6). Par la suite, un ou des appressoria sont formés à la surface des cellules de l'exoderme de la racine. À partir de ce moment et jusqu'à la pénétration de l'hyphe dans l'espace intercellulaire de la racine, une suite de signaux précis sont échangés et la colonisation est vraisemblablement initiée sous le

contrôle de la plante (Bonfante et Perotto, 1995). Le réseau mycélien du champignon se développe simultanément à l'extérieur et à l'intérieur des tissus racinaires d'une plante (Figure 1.6). La progression du champignon dans une racine est cependant limitée aux cellules du cortex car le champignon ne semble pas compétent pour dégrader la subérine de l'endoderme (Bonfante et Perotto, 1995). De plus, le champignon ne colonise que rarement les cellules de l'apex des racines et jamais les cellules méristématiques (Lee et Ratcliffe, 1990). Les cellules de l'apex sont très peu vacuolisées. La vacuole ayant une fonction de stockage et le champignon ayant une fonction de translocation de nutriments à la racine, il semble logique de supposer que la racine limitera la croissance du champignon la colonisant à des cellules pouvant accumuler les éléments transloqués par le champignon. Les champignons endomycorhiziens déploient des structures de morphologie et de fonction spécifiques, les arbuscules (Gianinazzi, 1983; Smith et al., 1994), dans la zone comprise entre la paroi et la membrane plasmique de la cellule racinaire. En fait, la membrane plasmique de la cellule racinaire s'invagine autour des nombreuses ramifications de l'arbuscule de tel sorte que le cytoplasme des deux organismes reste séparé par la paroi cellulaire fongique et les deux membranes plasmiques respectives. La durée de vie des arbuscules est limitée; Cox et Tinker (1976) ont observée une viabilité de 4 à 15 jours dans le cas d'oignons colonisés par le champignon *Glomus mosseae*. Deux morphologies d'arbuscules ont été observées : de type Arum et de type Paris. Le type Arum forme des structures arbusculaires ressemblant à la partie aérienne d'un arbre alors que pour le type Paris, les structures sont composées d'un enroulement d'hyphe.

Ces pénétrations dans les tissus de la racine par un organisme étranger déclenchent normalement une réaction de défense par la plante pour empêcher, sinon limiter, le développement de l'agresseur. Dans le cas des champignons mycorhiziens à arbuscules, il semblerait que la réaction de défense ne soit pas inhibée sur l'ensemble des tissus racinaires mais plutôt localement dans les cellules colonisées (Volpin et al., 1994; Vierheilig et Piché, 1995; Barber et al., 1998).

L'ensemble de la dynamique endomycorhizienne semble donc être gérée par une signalisation cellulaire et moléculaire continue entre les deux organismes durant l'ensemble de leurs cycles de vie respectifs (Koide et Schreiner, 1992; Bonfante et Perotto, 1995). La connaissance des substances produites par la racine, stimulant ou inhibant le développement du champignon apparaît donc comme une avenue importante de compréhension de la régulation de la symbiose.

#### *1.1.3.1 Les réseaux mycélien et racinaire: les vases communicants*

L'ensemble du réseau mycélien est coenocytique et ne forme généralement qu'une seule cellule multinucléaire, au sens où il n'y a pas de septation (Kendrick, 1985), tel un réseau de canalisations interconnectées. Les hyphes extraracinaires (dans le sol) sont compétents à puiser directement certains composés tel le phosphate inorganique par un système à co-transport avec des protons tel que décrit pour les plantes (Harrison et van Buuren, 1995; Pfeffer et al., 1998), et l'azote sous forme d'ions nitrate et ammonium (Pfeffer et al., 1998). Jayachandran et al. (1992) proposent également une compétence

des hyphes à puiser du phosphate sous une forme organique tel l'acide phytique et certains acides nucléiques. L'affinité du champignon pour le phosphate inorganique est supérieure à celle des racines de leur plante-hôte tel qu'observé par Cress et al. (1979) avec des plants de tomate : la constante de haute affinité ( $K_{m,1}$ ) passant de  $3,9 \mu\text{M}$  pour les racines non-mycorhizées à  $1,6 \mu\text{M}$  lorsque mycorhizées par *Glomus fasciculatus*.

La dynamique symbiotique est souvent définie en termes de processus de translocation : 1) de phosphate inorganique et d'azote ( $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ) (Ames et al., 1983) du champignon aux cellules colonisées de la racine-hôte (Cox et al., 1980; Smith, 1980; Pfeffer et al., 1998), et 2) de glucides des cellules colonisées aux hyphes intraracinaires du champignon (Smith, 1980; Pfeffer et al., 1998). Les hyphes intercellulaires constitueraient les points d'entrée par où le champignon endomycorhizien puiserait les glucides de la plante-hôte (Gianinazzi, 1983; Smith et al., 1994; Pfeffer et al., 1998). Le réseau intraracinaire a aussi accès aux ions et composés présents dans la zone apoplastique.

Le réseau mycélien extraracinaire peut représenter plus de 80 fois le réseau racinaire soit,  $80 \text{ cm/cm}$  de racine (Clarkson, 1985). Le champignon endomycorhizien agit donc comme un intermédiaire actif entre le sol et la plante. On peut alors comprendre l'appellation d'engrais biologique que l'on attribue à ces champignons et d'ailleurs, différentes études ont démontré qu'ils peuvent permettre de diminuer les besoins exogènes en engrais et pesticides (Menge, 1982; Trappe et al., 1984; Garbaye, 1991).

Les engrais n'ont qu'un effet à court terme alors qu'une symbiose durera vraisemblablement la vie de la plante-hôte si les conditions environnementales le permettent.

## **1.2 PROBLÉMATIQUE DE LA PRODUCTION À GRANDE ÉCHELLE DE PROPAGULES DE CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS À ARBUSCULES**

L'intérêt associé à l'utilisation en agriculture de champignons mycorhiziens à arbuscules comme un partenaire favorisant le développement de la plante a été mentionné dans la section précédente. Les paragraphes suivants présentent les aspects relatifs à la production d'inoculant endomycorhizien. L'inoculant représente une quantité donnée de propagules d'un champignon endomycorhizien prêtes à être utilisées pour initier une symbiose.

### **1.2.1 L'intérêt commercial**

Tel que cité précédemment, près de 80% des plantes se développant dans un environnement naturel sont mycorhizées. Les effets bénéfiques de la symbiose mycorhizienne à arbuscules pour la croissance et la protection des plantes sont connus (Plenchette et Strullu, 1995). Cependant, l'agriculture intensive qui vise à obtenir les plus hauts rendements possibles pour chaque culture a recourt à une utilisation massive d'intrants chimique et à des techniques culturales qui contribuent à détruire la microflore naturelle. Ces pratiques entraînent une dégradation accélérée des sols, altérant les écosystèmes naturels et favorisant les maladies et le développement d'insectes nuisibles (Hamel, 1995; Plenchette et Strullu, 1995). L'utilisation



potentielle des champignons endomycorhiziens en agriculture tient au fait que la course au rendement semble atteindre ses limites et qu'une forme d'agriculture intégrée assurant un développement durable soit encouragée. L'utilisation de champignons endomycorhiziens pourrait permettre de modifier les pratiques agricoles par une réduction des intrants chimiques (engrais et pesticides) et de tendre vers des pratiques assurant un développement durable.

### **1.2.2 Les moyens de production actuels d'inoculants mycorhiziens à arbuscules**

L'inoculation des sols en champignons endomycorhiziens requiert qu'il y ait disponibilité sur le marché de cet inoculant. Il existe quelques producteurs<sup>1</sup> commerciaux d'inoculant mycorhizien dont Premier Tech (Canada), Reforestation Technologies International (États-Unis), Plant Health Care (États-Unis) et Biorize (France). Ceux-ci utilisent une technique (ou des variantes) dite de première

---

<sup>1</sup> En plus des producteurs privés, différents organismes, dont la banque européenne des Glomales (BEG), INVAM aux États-Unis et DAOM au Centre de recherches sur les terres et les ressources biologiques au Canada entretiennent des banques de champignons endomycorhiziens.

génération développée par Plenchette et al. (1982), soit la co-culture sur des plantes entières (souvent le poireau et le maïs) en pot sur différents substrats (terre, perlite, turface) (Mosse et Thompson, 1984; Hung et Sylvia, 1988; Dugassa et al., 1995), en aéroponie (Hung et Sylvia, 1988), en hydroponie (Dugassa et al., 1995) et selon la technique du film nutritif (Mosse et Thompson, 1980, 1984).

Plusieurs désavantages subsistent avec les techniques de première génération. Les temps de production sont longs (2 à 3 mois), les surfaces de production élevées et les résultats trop tributaires des conditions environnementales. Les propagules sont récoltées à même le substrat et les racines (Sylvia et Jarstfer, 1990; 1992) dans des conditions microbiologiques non contrôlées. Pour ces techniques, les coûts d'opération sont élevés et limitent la compétitivité du produit à l'échelle mondiale (données de Premier Tech Ltée).

### **1.2.3 Le développement d'un procédé de deuxième génération**

#### *1.2.3.1 La culture dualiste in vitro*

Ces dernières années, une nouvelle approche a été développée utilisant des racines excisées pour étudier le processus de mycorhization en conditions stériles (Mosse et Hepper, 1975). L'idée était très intéressante car on se rapprochait de conditions pouvant être exploitées en bioréacteur. Cependant, ces racines ont un taux de croissance qui peut être faible (Mosse et Hepper, 1975). Par la suite, des racines transformées

génétiqnement par *Agrobacterium rhizogenes* ("hairy roots") furent utilisées comme hôte végétal au champignon en culture dans des conditions stériles en boîtes de Pétri (Mugnier et Mosse, 1987). Cette approche de culture in vitro posait les bases d'un procédé de production de deuxième génération de propagules de champignons endomycorhiziens.

Les plantes dicotylédones sont susceptibles d'être transformées par une bactérie (*Agrobacterium rhizogenes*). Celle-ci agit en transférant une partie de son plasmide Ri (T-DNA) (Ri pour "root inducing") qui modifie le métabolisme des tissus infectés en l'orientant sur la croissance des racines. Une fois le T-DNA incorporé dans le génome des cellules infectées, ces dernières se différencieront en racines et produiront des opines et des agropines (Tepfer et Tempé, 1981) qui sont des substrats pour la bactérie. Ce processus provoque une maladie découverte en 1934 lors d'une épidémie ayant ravagé des pépinières de vergers (Hildebrand, 1934, cité par Nilsson et Olsson, 1997). Il s'agit d'un cas naturel de génie génétique et métabolique (Nilsson et Olsson, 1997).

Les racines ainsi transformées peuvent être repiquées indéfiniment sur un milieu nutritif adéquat, sans hormones exogènes avec un taux de croissance supérieur aux racines attachées à la plante (Mugnier, 1988). Comme indiqué précédemment, la racine dans son état naturel est compétente pour hydrolyser et métaboliser le saccharose lui arrivant normalement par les tissus du phloème. Dans le cas des racines excisées cultivées in vitro, une source exogène de glucides doit impérativement être ajoutée au milieu nutritif.

Les glucides seront alors assimilés par les voies symplastique ou apoplastique tel que décrit pour l'assimilation des ions.

Par ses possibilités de confinement en culture aseptique, la culture des racines transformées inoculées avec des spores de champignons endomycorhiziens (Bécard et Fortin, 1988) a d'abord facilité les études visant la compréhension de certains processus physiologiques, particulièrement les mécanismes de reconnaissance et les signaux échangés entre la racine et le champignon endomycorhizien lors de l'établissement de la symbiose (Bécard et Fortin, 1988; Bécard et Piché, 1989a et b; Koide et Schreiner 1992, Phillips et Tsai, 1992; Bécard et al., 1998). La technique a aussi ouvert la voie à une extrapolation de culture en bioréacteurs.

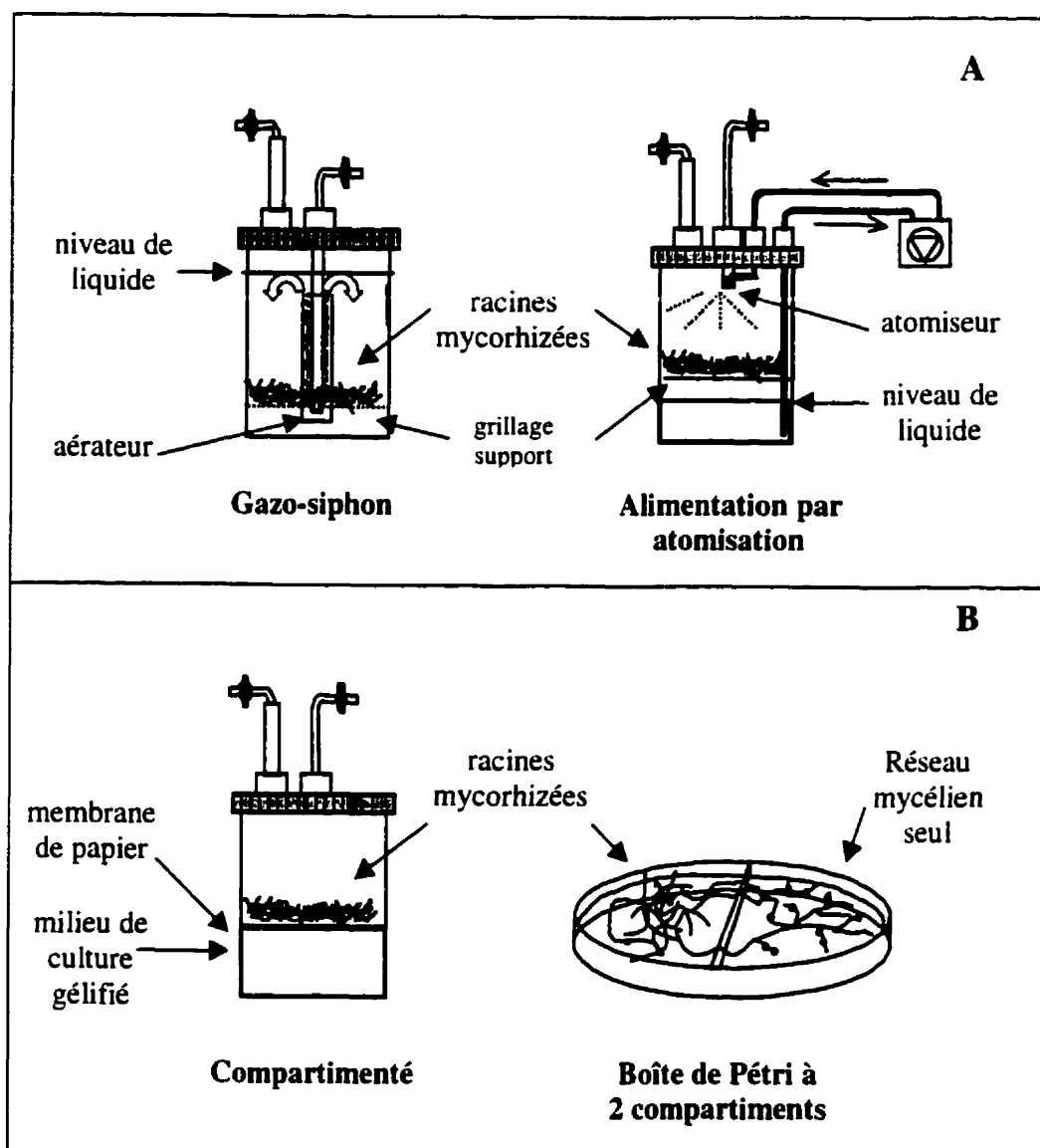
#### *1.2.3.2 L'approche en bioréacteur*

Les travaux de cette thèse font suite à une première phase expérimentale au cours de laquelle l'auteur a contribué à démontrer la faisabilité technique de la production de propagules de champignons endomycorhiziens en bioréacteurs (Chavarie et al., 1992). Plusieurs configurations de bioréacteurs utilisés pour la culture de racines transformées ont été testées. Trois configurations ont été retenues et sont présentées à la Figure 1.8A.

Tout d'abord, un type gazo-siphon (Kondo et al., 1989; Taya et al., 1989; Hilton et Rhodes, 1990; Whitney, 1992; McKelvey et al., 1993; Nuutila et al., 1995) où les racines sont déposées sur une grille et submergées dans le milieu nutritif et, un bioréacteur dont

les racines sont aussi déposées sur une grille mais avec une alimentation continue du milieu nutritif sous forme brouillard par atomisation (Wilson et al., 1990; Dilorio et al., 1992; Whitney, 1992; McKelvey et al., 1993; Ramakrishnan et al., 1994) ont été étudiés. Les bioréacteurs gazo-siphon et ceux alimenté par atomisation du milieu de culture ont démontré leur capacité à cultiver les symbiotes en maintenant une présence mycélienne intraracinaire avec quelques milliers de spores produites par cultures avec l'utilisation d'un milieu minimal (M) (Bécard et Fortin, 1988). Cependant, très peu de vésicules intraracinaires ont été observées. Ces deux configurations de bioréacteur représentent un haut potentiel de mise à l'échelle industrielle.

Menés en parallèle des études de faisabilité citées précédemment, des travaux ont porté sur l'évaluation du concept de culture compartimentée. Une boîte de Pétri à deux compartiments (Figure 1.8B) a été utilisée: les racines mycorhizées se développant dans un compartiment et le champignon étant libre de se développer dans les deux compartiments (les deux compartiments contenant 20 mL de milieu M gélifié à 0,4% phytigel (Sigma)). Ce système a permis de multiplier par 5 le nombre de spores produites par boîte de Pétri à un seul compartiment, soit environ 25 000 spores par boîte (St-Arnaud et al., 1996).



**Figure 1.8** Technologies de production de 2<sup>ème</sup> génération. A, Configurations de bioréacteurs non-compartmentés (Chavarie et al., 1992). B, Configurations de bioréacteurs compartimentés (Fortin et al., 1996).

Fait intéressant, les spores sont essentiellement produites dans le compartiment réservé au champignon. Toutefois, la production de vésicules intraracinaires demeure faible et similaire au système à un compartiment. St-Arnaud et al. (1996) ont suggéré que cette forte stimulation de la croissance extraracinaire du champignon est due à l'absence dans le compartiment sans racine de certains exsudats racinaires probablement inhibiteurs.

Cette technologie de culture est brevetée (Fortin et al., 1996), avec une participation de l'auteur, pour des transpositions du concept de culture compartimentée en bioréacteur. Il s'agit ici de la troisième configuration de bioréacteur retenue dans le cadre de cette thèse. Cette configuration vise à limiter le développement des racines mycorhizées dans le milieu nutritif sans empêcher, cependant, le développement du champignon. Le bioréacteur compartimenté conçu comporte une membrane de papier séparant les racines mycorhizées du milieu nutritif gélifié (Figure 1.8B). Des travaux portant sur l'évaluation de cette configuration originale de bioréacteur ont révélé des niveaux de production en spores et en vésicules du champignon *Glomus intraradices* très élevées avec 110 000 spores et 479 000 vésicules par bioréacteur contenant 250 mL de milieu M gélifié (0,4% phytigel) et inoculés à partir de 1 g WW (masse sèche) de racines mycorhizées (Gaudette, 1997). Fait intéressant, les spores sont produites dans un premier temps et les vésicules par la suite alors qu'aucun des éléments du milieu de culture n'est encore limitant. Les taux spécifiques de production de spores et de vésicules sont similaires avec 0,053 d<sup>-1</sup> (calculés à partir des données de Gaudette, 1997). Les spores et les vésicules isolées produites dans ce bioréacteur ont démontré une efficacité similaire à

coloniser des plants de tagètes (Nantais, 1997). Ces niveaux de production n'ont pas d'équivalent, pour un même volume de culture, dans la littérature scientifique. Comparée aux plus hautes productions publiées pour *G. intraradices*, sur des plants de patates sucrées en culture aéroponique (Hung et Sylvia, 1988), la production en propagules totales obtenue en bioréacteur représente la production de plus de 100 plants pour un temps de production similaire de 3 à 4 mois.

En absence de la membrane de papier, la production de spores demeure inchangée alors que la production de vésicules chute aux niveaux normalement observés pour les cultures en boîte de Pétri standard (un compartiment). Ces résultats ne sont pas nécessairement contradictoires avec la suggestion de St-Arnaud et al. (1996) citée précédemment car il se peut que des exsudats soupçonnés être inhibiteurs pour la production de spores soient des molécules hydrophobes ne pénétrant pas profondément dans le volume (3 cm d'épaisseur) de gel du bioréacteur compartimenté comparativement à la boîte de Pétri avec son film (5 mm) de gel. Les performances du bioréacteur à gel-papier ont servi de référence pour l'ensemble des travaux.



### 1.3 OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'objectif principal de cette thèse de doctorat est de caractériser le comportement des symbiotes champignons endomycorhiziens/racines de plantes par des études conciliées de leur physiologie et de leur nutrition en vue d'optimiser la productivité en propagules de champignons en bioréacteur en terme de quantité (propagules/jour/volume de culture) et de qualité (germination et infectivité élevées). Les configurations de type gazo-siphon et alimenté par atomisation sont étudiées en détails étant donné leur potentiel de mise à l'échelle industrielle. Deux champignons endomycorhiziens sont étudiés. Les études physiologiques sont effectuées avec un champignon à arbuscules, le *Gigaspora margarita* Becker & Hall (DAOM 194757) et un champignon à arbuscules et à vésicules, le *Glomus intraradices* Schenck & Smith. Les travaux portant sur la nutrition et les études de bioréacteurs ne sont effectués qu'avec *G. intraradices* pour des raisons liées au potentiel industriel immédiat de ce champignon.

Pour atteindre cet objectif principal visant à améliorer la compréhension du système symbiotique plante-champignon et à l'appliquer à un procédé de production en bioréacteur, quatre sous-objectifs sont poursuivis:

- *Démontrer la faisabilité de la production de propagules du champignon endomycorhizien à arbuscules et à vésicules Glomus intraradices en bioréacteur en culture dualiste sur racines de carotte transformées.* Ces travaux sont importants

pour la communauté scientifique intéressée aux endomycorhizes étant donné qu'aucune étude n'a encore été publiée sur le développement d'un procédé de production en bioréacteur. Ce sous-objectif vise à étudier la croissance et les biocinétiques nutritionnelles des symbiotes en bioréacteurs gazo-siphon et alimenté par atomisation du milieu de culture. De plus, l'influence des conditions d'inoculation des bioréacteurs en racines transformées mycorhizées, décrite comme un paramètre déterminant pour les racines transformées (Mosse et Hepper, 1975; Bhadra et Shanks, 1995) sur le comportement des symbiotes en bioréacteur est étudiée.

- *Relier les phénomènes macroscopiques croissance et formation de propagules du champignon à des états physiologiques observables.* L'idée de base consiste à développer une technique d'observation in vivo permettant de suivre en temps réel l'état physiologique d'un hyphes de champignon endomycorhizien pour reconnaître les états de stimulation et d'inhibition du champignon. Pour ce faire, un marqueur physiologique, le pH cytosolique, est proposé et validé. L'importance de ce paramètre dans la régulation des processus cellulaires comme l'activité enzymatique (Isfort et al., 1993) est connue. Les protons intracellulaires ont aussi été décrits comme un messager secondaire chez les cellules de mammifères (Kurkdjian et Guern, 1989) et souvent reliés à la viabilité cellulaire (Imai et Ohno, 1995). L'utilisation d'une sonde moléculaire, le BCECF-AM (Molecular Probes inc., Oregon, É.-U.) est préconisée avec un suivi par microfluorométrie. Les

observations sont concentrées aux apex des hyphes étant donné que ces champignons présentent une croissance apicale et que cette zone est supposée être la plus active notamment pour l'assimilation des nutriments (Harold, 1994) et donc sensible aux réactions physiologiques. L'influence du stade de développement des champignons à arbuscules *Gigaspora margarita* et du champignon à arbuscules et à vésicules *Glomus intraradices* sur le pH cytosolique d'apex principaux a été étudiée. L'effet d'imposer un stress osmotique et/ou nutritionnel aux racines sur le pH d'hyphes extraracinaires de *G. intraradices* a aussi été étudié.

- *Développer les modèles macroscopiques biocinétiques de comportement décrivant la croissance du champignon, des racines et la production de propagules fongiques.*

Ce sous-objectif cherche à établir les bases d'un modèle structuré reliant la production de spores et de racines à des paramètres nutritionnels clefs. Tel qu'il a été mentionné aux sections précédentes, la relation symbiotique est décrite en terme de translocation de phosphate (en conditions limitantes) du champignon à sa racine-hôte ainsi que de glucides (conditionnelle à la survie du champignon) de la racine vers le champignon. La construction du modèle biocinétique structuré décrivant le comportement en culture des racines (croissance, consommation) et du champignon (production et consommation) est basée sur les concentrations extra et intracellulaires en phosphate inorganique ainsi qu'intracellulaires en glucides. Le modèle développé est validé par une série de cultures en boîtes de Pétri en milieu liquide (variations de la concentration initiale en ion phosphate). L'atteinte de ce sous-objectif permet

d'améliorer la compréhension des phénomènes nutritionnels impliqués dans la production des spores. Seul le champignon à arbuscules et à vésicules *Glomus intraradices* est étudié.

- *Poser les bases d'un bioprocédé maximisant la productivité en termes de qualité et de quantité de propagules de champignons sous les formes spores et vésicules.* Les travaux visent à transposer les performances de la culture compartimentée en une configuration de bioréacteur qui puisse être mise à l'échelle industrielle. Le bioréacteur opéré en mode brouillard, possédant une flexibilité d'opération et de conception supérieure à celle du bioréacteur gazo-siphon, est utilisé comme la configuration de base. Ce bioréacteur est modifié par l'ajout d'une matrice granulaire supportant les racines mycorhizées à la surface de la matrice en permettant au champignon de s'y développer. Il s'agit d'une compartimentation physique permettant au champignon d'être continuellement en contact avec le milieu de culture et d'imposer divers stress préférentiellement à sa racine-hôte.

## 1.4 ORGANISATION DE LA THÈSE

Au chapitre 2, un article intitulé : "Production of AM fungi propagules in an airlift bioreactor" démontre à la communauté scientifique, pour la première fois, la faisabilité de la production de propagules de champignons endomycorhiziens en

bioréacteur. L'étude du comportement en culture submergée de racines transformées de carotte mycorhizées par le champignon *G. intraradices* est présentée. Cet article a été soumis pour publication à la revue *Biotechnology and Bioengineering*.

Au chapitre 3, un article intitulé : "Intracellular pH in AM fungi: a symbiotic physiological marker" présente la mise au point et la validation d'une technique de mesure en temps réel du pH intracellulaire des champignons endomycorhiziens. L'influence de l'état physiologique de la cellule du champignon sur le profil pH de l'apex principal est illustrée. Cet article a été publié dans la revue *Plant Physiology* (1998, Vol. 116, pp. 1279-1288).

Au chapitre 4, un article intitulé : "Regulation of mycorrhizal symbiosis: development of a nutritional model" propose une approche dualiste de modélisation de la relation symbiotique basée sur les facteurs clefs nutritionnels contrôlant la dynamique de la symbiose. Le modèle est élaboré à partir de données expérimentales. Cet article a été soumis pour publication à la revue *Plant Physiology*.

Au chapitre 5, intitulé : "Production en bioréacteur de propagules du champignon endomycorhizien *G. intraradices* en culture symbiotique sur des racines de carotte transformées". Un bioréacteur alimenté par atomisation est présenté. Des modifications de configuration et d'opération sont apportées pour imposer une culture compartimentée et augmenter significativement les productions de spores et de vésicules.

## CHAPITRE II

### PRODUCTION OF AM FUNGI PROPAGULES IN AN AIRLIFT BIOREACTOR

Ce chapitre traite de la culture symbiotique de racines de carotte (*Daucus carota*) transformées par *Agrobacterium rhizogenes* et mycorhizées par le champignon endomycorhizien à arbuscules (AM) *Glomus intraradices* dans deux systèmes de culture submergée en milieu liquide : en bioréacteur gazo-siphon et dans un système témoin en boîte de Pétri. Un milieu minimal (M) en sels minéraux, ayant déjà été développé spécifiquement pour la culture symbiotique, a été utilisé. Les cultures en bioréacteur ont été alimentées par un courant gazeux composé d'air enrichi à 2 % CO<sub>2</sub>. L'effet de la masse de racines mycorhizées inoculées par rapport au volume de milieu de culture, défini comme le ratio d'inoculation, a été étudié sur la croissance des symbiotes. Une masse critique en inoculum de ~ 0,6 g masse sèche (DW) • L<sup>-1</sup> de milieu de culture a été observée au-delà de laquelle la croissance des racines est affectée. Un taux spécifique de croissance des racines mycorhizées de 0,021 d<sup>-1</sup> et un taux spécifique de production de spores de 0,035 d<sup>-1</sup> ont été observés pour des cultures en boîte de Pétri pour une masse d'inoculum critique. L'accroissement de la masse sèche racinaire et la production normalisée en spores, définie en terme du nombre de spores • g<sup>-1</sup> DW inoculum • L<sup>-1</sup> de milieu de culture, en bioréacteur gazo-siphon ont été inversement proportionnels au ratio d'inoculation. Les productions normalisées

maximales de spores en bioréacteur gazo-siphon sont demeurées inférieures d'un facteur de dix face aux résultats en boîte de Pétri avec  $1,82 \times 10^5 \pm 4,05 \times 10^4$  (SEM) spores  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW inoculum  $\bullet$  L<sup>-1</sup> de milieu de culture en 83 à 107 jours avec l'utilisation du plus petite concentration d'inoculum testée (0,13 g DW $\bullet$ L<sup>-1</sup> de milieu de culture). L'état de mycorhization des racines a été maintenu tout au long des cultures avec un niveau de colonisation racinaire de 25 à 75 % en présence mycélienne. Les spores produites récoltées ont eu des pourcentages de germination similaires variant de 58 à 60 % pour les deux systèmes de culture. La présence de propagules intraracinaires a été mise en évidence en mesurant la capacité de fragments de racines récoltées à initier de nouvelles croissances d'hyphes extraracinaires de champignon. Le rendement en masse racinaire sur le phosphate a été inférieur en boîte de Pétri par rapport au bioréacteur gazo-siphon (-23 %). Ce travail pose les bases technologiques d'un procédé de production de propagules de champignons AM en bioréacteur.

Cet article a été soumis à la revue *Biotechnology and Bioengineering*.

## MANUSCRIT #1

# PRODUCTION OF AM FUNGI PROPAGULES IN AN AIRLIFT BIOREACTOR

M. Jolicoeur <sup>\*</sup> <sup>1</sup>, Williams R.D. <sup>1</sup>, Chavarie C. <sup>1</sup>, Fortin J.A. <sup>2</sup> and Archambault J. <sup>3</sup>

1. *École Polytechnique de Montréal, Department of Chemical Engineering ,BIOPRO Research Centre, P.O. Box 6079 Centre-Ville Station, Montréal, Québec, Canada, H3C 3A7*

2. *Institut de Recherche en Biologie Végétale, Université de Montréal, 4101 Sherbrooke St. East, Montréal, Québec, Canada, H1X 2B2*

3. *Université du Québec à Trois-Rivières, Engineering School, Department of Chemical Engineering , P.O. Box. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7*

*\* Corresponding Author*

## 2.1 SUMMARY

This work addresses the symbiotic culture of *Agrobacterium rhizogenes* transformed *Daucus carota* hairy roots mycorrhized with the arbuscular-mycorrhizal (AM) fungus *Glomus intraradices* in two submerged culture systems: Petri dish and airlift bioreactor. A low salt minimal (M) liquid medium previously developed for hairy



root-AM fungi co-culture was used and bioreactor cultures were fed with air enriched with 2% CO<sub>2</sub>. The effect of the mycorrhized roots inoculum-to-medium volume ratio on the growth of both symbionts was studied. The critical inoculating condition was observed at ~0.6 g dry biomass (DW) • L<sup>-1</sup> medium above which root growth was significantly reduced. A low growth rate of 0.021 d<sup>-1</sup> and specific spore production rate of 0.035 d<sup>-1</sup> were observed for Petri dish cultures using critical inoculum. The mycorrhized root mass increase and normalized spore production in airlift bioreactors, defined as spores • g<sup>-1</sup> DW inoculum • L<sup>-1</sup> medium, were inversely proportional to the inoculum-to-medium ratio. Maximum spore production in airlift bioreactor was ten times lower than that of Petri dish cultures and obtained with the lowest inoculum assessed (0.13 g DW • L<sup>-1</sup> medium) with  $1.82 \times 10^5 \pm 4.05 \times 10^4$  (SEM) spores • g<sup>-1</sup> DW inoculum • L<sup>-1</sup> medium in 83 to 107 days. Mycorrhized roots remained colonized (25-75%) and spores produced in both culture systems showed similar germination levels of 58 to 60%. Intra-root propagules were evidenced by the ability of root pieces to initiate new external hyphal growth. Mycorrhized root biomass yield on phosphate was lower for Petri dish cultures than airlift bioreactor cultures (-23%). This work proposes a second generation bioprocess for AM fungi propagule production in bioreactors.

## 2.2 KEY WORDS

*Daucus carota*, *Glomus intraradices*, Endomycorrhizae, AM fungi, propagules, vesicles, spores, hairy roots, bioreactors

## 2.3 INTRODUCTION

The widespread use of conventional fertilizers has significantly increased crop yields. Chemical fertilizers, however, have detrimental effects on the environment due to high levels of run-off resulting in contamination of streams and groundwater. An attractive alternative is the use of the natural plant growth stimulant arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi (Wood and Cummings, 1992). These fungi are obligate symbionts that co-evolved with vascular plants (Simon et al., 1993). Over two thirds of plants species are naturally mycorrhized (Newsham et al., 1995). This plant-AM fungi association is of high interest as it has been shown to improve plant nutrient uptake (Smith, 1980), growth (Bethlenfalvay, 1992) as well as pathogen (Andrade et al., 1997; St-Arnaud et al., 1997, 1995, 1994) and drought resistance (Arora et al., 1991; Khasa et al., 1990; Trappe et al., 1984 ). Thus, a source of AM fungi inocula combined with appropriate field management would permit efficient and ecologically improved agricultural practices.

Few companies offer AM fungi inocula for agricultural and horticultural uses. Endomycorrhizal inocula are available in the form of spores (propagules formed

outside the root) and root pieces containing vesicles (propagules formed inside the root tissue) (Sylvia and Jarstfer, 1992; 1990). They are added directly into the surrounding soil of seeds and plantlets. Fungal spores can also be palletized with seeds (Hall, 1978). Once in the soil, the germination of AM fungi propagules can be induced by specific stimulating factors such as CO<sub>2</sub> and root exudates (Bécard and Piché, 1989) in a humid environment. The elongation of germinating hyphae is driven by the propagule energy reserves until it finds and colonizes a plant root, and draws sugars from the plant (Pfeffer et al., 1998; Mosse and Hepper, 1975).

Currently, production methods of AM fungi are based on their natural proliferation process. Whole plants are inoculated with propagules, a mixture of mycorrhized root pieces and spores, and grown on various soils or substrates (Mosse and Thompson, 1984; Hung and Sylvia, 1988; Dugassa et al., 1995), aeroponically (Hung and Sylvia, 1988), hydroponically (Dugassa et al., 1995) or by using nutrient liquid film technique (Mosse and Thompson, 1980 and 1984). Originally developed for growing plants (Zobel et al., 1976), these production systems require large facilities operated under more or less controlled conditions. Problems encountered include contamination and variability of product quality. Furthermore, it remains unclear whether these systems can produce enough endomycorrhizal inocula to meet the large potential world demand.

Approaches have been previously developed for the aseptic co-culture of these symbionts. Initial work involved surface-sterilized excised roots as fungal host (Mosse and Hepper, 1975) which, however, required the addition of plant growth regulators. Later, *Agrobacterium rhizogenes* transformed roots were suggested as hosts for endomycorrhizae fungi propagation (Mugnier and Mosse, 1987). After modifications of the culture medium and growth conditions, Bécard and Fortin (1988) obtained a significant growth of hyphae and spore production in Petri dish cultures using a solidified minimal (M) medium based on White's medium. Recently, this symbiotic AM fungi and hairy root co-culture system has been substantially improved in terms of spore production using dual-compartment Petri dishes (Fortin et al., 1996; St-Arnaud et al., 1996). The main interest of mycorrhized hairy roots as fungal host is that they grow faster than non-transformed roots and do not require exogenous plant growth regulators. Therefore, this system represents an attractive approach for the large scale production of AM fungi inocula in bioreactors under controlled conditions.

Several studies have reported the culture of hairy roots in various bioreactor configurations for secondary metabolite production (Toivonen 1993). However, none of them involved the production of endomycorrhizae in bioreactor systems. Hairy roots have been grown under various submerged (Kondo et al., 1989; Taya et al., 1989; Hilton and Rhodes, 1990; Whitney, 1992; McKelvey et al., 1993; Nuutila et al., 1995) and mist conditions (sprayed liquid medium) (Ramakrishnan et al., 1994; McKelvey et al., 1993; Whitney, 1992; Dilorio et al., 1992; Wilson et al., 1990) as

well as in a rotating drum bioreactor (Kondo et al., 1989). The use of packing to support root growth in a mist bioreactor was shown to be efficient for root aeration and distribution (Ramakrishnan et al. 1994) but appears problematic during harvesting. Direct mechanical mixing was found detrimental to long roots, yielding short viable roots (Takayama and Takizawa, 1994) and increased cell debris (Kondo et al. 1989). Mixing shear is also expected to be detrimental to the rigid chitin-based cell wall of endomycorrhizal hyphae.

In this context, the objectives of this study were: first, to evaluate the potential of submerged cultures for the growth of the endomycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on *Daucus carota* hairy roots, and second, to study the performance of an airlift-type bioreactor configuration, previously found suitable for the growth of hairy roots, for the production of AM fungi propagules. This bioreactor presents interesting scale-up potential and offers flexible operational and culture conditions.

## 2.4 MATERIALS AND METHODS

### 2.4.1 Hairy Root and AM Fungi Cultures

Hairy root cultures of *Daucus carota* were obtained as described (Bécard and Fortin, 1988) and subcultured monthly by transfer of ~1 g wet weight (WW) (0.06 g dry

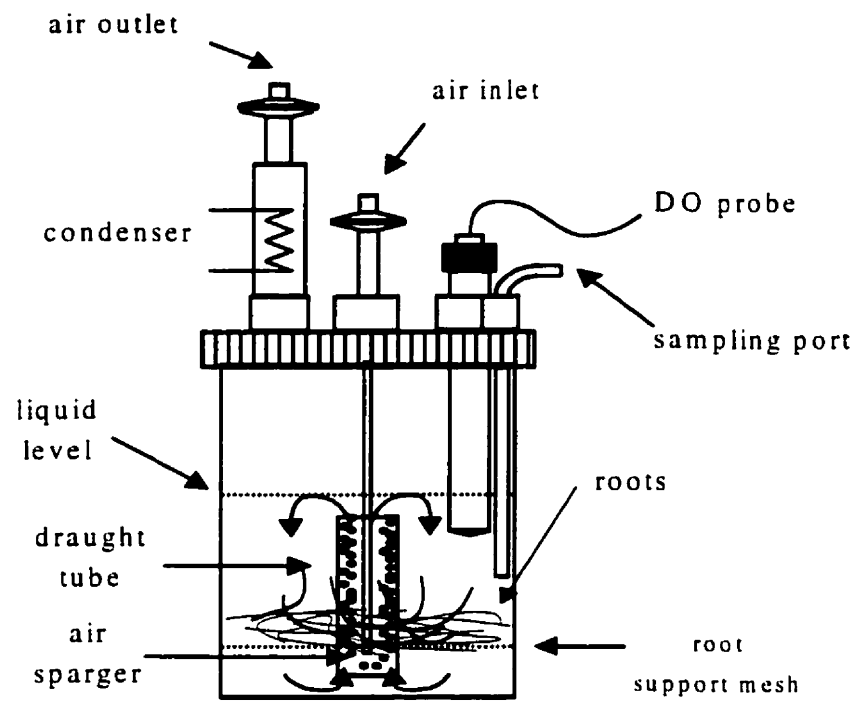
weight (DW)) in 80 mL modified White's medium (Bécard and Fortin, 1988) in 250 mL Erlenmeyer shake flasks agitated at 120 rpm and maintained at  $23\pm1^{\circ}\text{C}$  in continuous light.

Cultures of the AM fungus *Glomus intraradices* with *D. carota* hairy roots were originally started from spores isolated from soil as described by Chabot et al. (1992). Subculture of the root-fungus pair was performed by transfer of colonized root pieces to fresh solid M (Bécard and Fortin, 1988) medium (20 mL of media solidified with 0.4% Gellan Gum (ICN Biochemicals, Cleveland, OH)) in Petri dishes every 2-3 months. All Petri dishes were incubated in the dark at  $26\pm1^{\circ}\text{C}$ .

Bioreactor inocula were prepared in Petri dishes by addition of a 1 x 1 x 0.5 cm gel piece containing entrapped spores and hyphae produced in solid cultures, to 0.5 g WW (wet weight) non-mycorrhized hairy root, obtained in shake flasks, in 20 mL liquid M medium (Bécard and Fortin 1988) for 3 months. Prior to bioreactor inoculation, dishes were examined visually to confirm colonization (presence of extra-root spores and hyphae). Mycorrhized roots were harvested without the inoculum gel piece, cut into ~1 cm pieces with a scalpel and transfer into the bioreactor. Using the same type of inoculum, Petri dishes liquid cultures were also carried out as control cultures. The spore content of the inocula was of  $2300 \pm 600$  spores $\cdot\text{g}^{-1}$  DW.

### 2.4.2 Airlift Bioreactor

The airlift bioreactors were made of 1.2-L total volume (11 cm ID x 13 cm height) autoclavable polycarbonate jars (Nalgene, Sybron International, Rochester, NY, USA) with a modified cover (Figure 2.1). A central glass draught tube (ID = 2.54 cm) was installed 2 cm above the bottom and below the liquid level. Medium circulation and oxygenation were provided by a gas flow rate of  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  through a porous ( $2 \mu\text{m}$ ) stainless steel sparger which generated fine bubbles at the bottom of the draught tube. This gas flow rate yielded an initial oxygen mass transfer coefficient ( $k_{La_0}$ ) of  $8 \text{ h}^{-1}$ . A stainless steel screen mesh (mesh size of 20) was installed 3 cm above the bottom to cover the annular section in order to prevent root circulation with the fluid drag. Sterile air filters (bacterial air vent : Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) and a liquid condenser ensured sterility and minimal liquid losses by evaporation throughout the cultures' duration. A dissolved oxygen probe (polarographic : Ingold, Urdorf, Switzerland) was installed in the bioreactor as illustrated in Figure 2.1. Cultures in this bioreactor were performed using an initial volume of 500 mL of liquid M medium. Medium and bioreactors were steam sterilized separately for 35 min ( $121^\circ\text{C}$ , 1 bar). All bioreactor cultures were fed with air enriched with 2%  $\text{CO}_2$ . Cultures were grown at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  under continuous light.



**Figure 2.1** Airlift bioreactor configuration



### **2.4.3 Analytical**

#### *2.4.3.1 Sampling and Harvesting*

Media from all bioreactor and Petri dish cultures were sampled at harvest. Liquid samples were filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further analysis. Roots were not sampled during bioreactor cultures but harvested at the end of each experiment. Biomass wet weight and residual liquid medium volume were measured and retained for further analysis. Root samples were withdrawn for wet and dry (24 h at  $80^{\circ}\text{C}$ ) weights as well as for level of colonization.

#### *2.4.3.2 Measurement of Propagule Production*

Propagule production was evaluated as spore number and AM fungi density per root length. A fraction of the biomass harvested was used for spore counts. This fraction was ground in a blender ( $20\text{ s}^{-1}$  for 30 s) in 500 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . 20 mL samples of the resulting suspension were placed in Petri dishes for spore number determination. A second fraction of the biomass harvested was then used for the evaluation of root colonization using chlorazol black E staining (Brundrett et al., 1984). The percentage of root length containing vesicles and/or intra-root hyphae was determined by observation of 2 mm sections. Viability of propagules was verified by culturing spores and root pieces ( $\sim 1\text{ cm}$ ) on solid M medium in Petri dishes. After three weeks, a plateau was reached for new fungal growth. The percentages of spores and root pieces

showing new external hyphal development were reported as the viability of the propagule sample assayed.

#### *2.4.3.3 Extracellular Nutrient Analysis*

Carbohydrates were analysed by an HPLC system consisting of a Waters model 6000A pump, a Gilson model 231/401 automatic injector, a Gilson model 132 refractive index detector, and a Hewlett-Packard model HP3394A integrator. Separation was achieved using a Biorad HPX-87C column maintained at 80°C and water as the mobile phase flowing at a rate of 1.0 mL•min<sup>-1</sup>.

Major ions were analysed using a Dionex (Dionex Canada Ltd, Oakville, Canada) HPLC system equipped with a gradient pump, an automated sampler, and a pulsed electrochemical detector in conductivity mode, all controlled with Dionex AI-450 software. Both anions and cations were analysed at 23±1°C. Anions were separated using a 4 x 250 mm IONPAC AS4A-SC column, a guard column (IONPAC AG4A-SC), and an anion self-regeneration suppressor (ASRS-1) to improve the signal-to-noise ratio. The mobile phase consisted of an aqueous bicarbonate buffer (1.8 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 1.7 mM NaHCO<sub>3</sub>) solution flowing at a rate of 2.0 mL•min<sup>-1</sup>. This allowed separation of all major anions present in the liquid M medium samples in 10 minutes. Cations were separated using a 4 x 250 mM IONPAC CS-12 analytical column, a guard column (IONPAC CG-12 Guard column), and a cation self-regenerating suppressor (CSRS-1) to reduce signal-to-noise ratio. The mobile phase was an aqueous

methanesulphonic acid (20 mM) solution flowing at a rate of  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , which was suitable to separate the cations within 10 minutes.

## 2.5 RESULTS

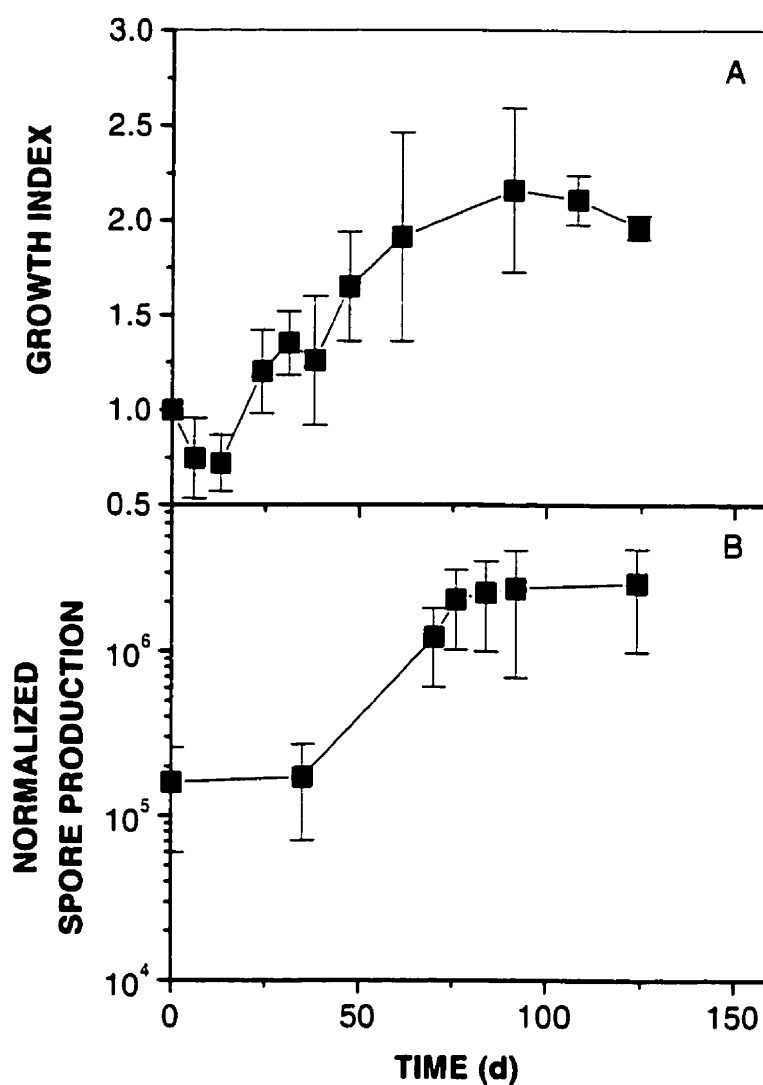
The study of endomycorrhizal symbiotic cultures in bioreactors presented a few major analytical difficulties. For instance, the interconnected AM fungus/hairy root network forming the growing biomass showed high heterogeneity in spore number and hyphae distribution in the root bed and in the degree of root colonization. Representative sampling of the biomass grown in bioreactors, as well as in Petri dishes, could be achieved only with great difficulty without disturbing the fungus/root network or dismantling the culture vessel. Consequently, whole cultures were harvested to measure biomass growth and propagule production. In this context, Petri dish cultures were carried out in triplicate while lengthy, more complex bioreactor cultures were not systematically repeated.

A second difficulty involved defining a common basis of comparison for production levels between Petri dish and airlift bioreactor submerged culture systems. For these two culture systems, the culture volume was taken to be the liquid medium volume. Therefore, propagule production results were normalized to the mycorrhized roots

inoculum (g DW) and initial liquid medium volume. Production results are thus expressed as propagule yields with respect to inoculation conditions.

### **2.5.1 Liquid Cultures in Petri Dishes**

The growth of mycorrhizal hairy roots in Petri dishes could be described by an exponential growth (Figure 2.2A) with a specific rate (DW) of  $0.021\text{ d}^{-1}$  (Table 2.1). Most roots remained immersed in the liquid phase while a few root tips grew above the liquid surface. New fungal hyphae and root tips were observed within days following inoculation.



**Figure 2.2** Dual culture performances of *Daucus carota* hairy roots mycorrhized with *Glomus intraradices* in liquid M medium in Petri dish. A, Mycorrhized *Daucus carota* hairy root growth, shown as growth index (harvested dry mass/inoculated dry mass). B, Normalized spore productions: in spores $\cdot$ g $^{-1}$  DW of inoculum $\cdot$ L $^{-1}$  medium. Cultures for inocula of  $0.60 \pm 0.11$  g DW $\cdot$ L $^{-1}$  medium. Error bars are standard deviations.

**Table 2.1** *Daucus carota* mycorrhized hairy roots growth for liquid M medium Petri dish cultures

inoculum <sup>(1)</sup>	(g DW • L <sup>-1</sup> )	0.60 ± 0.11	
μ	(d <sup>-1</sup> )	0.021 <sup>(4)</sup> ± 0.0037	r <sup>2</sup> = 0.88
Growth index <sup>(2)</sup>	(g • DW • g DW <sup>-1</sup> )	2.16 ± 0.434	
Y <sub>X/PO4</sub>	(g DW • mmol <sup>-1</sup> )	25.71 <sup>(5)</sup> ± 3.88	
Y <sub>X/NO3</sub>	(g DW • mmol <sup>-1</sup> )	0.33 <sup>(6)</sup> ± 0.026	r <sup>2</sup> = 0.87
Y <sub>X/K</sub>	(g DW • mmol <sup>-1</sup> )	0.64 <sup>(6)</sup> ± 0.056	r <sup>2</sup> = 0.84
Y <sub>X/S (total)</sub> <sup>(3)</sup>	(g DW • g <sup>-1</sup> )	0.39 <sup>(6)</sup> ± 0.016	r <sup>2</sup> = 0.84
r <sub>NO3</sub>	(d <sup>-1</sup> )	0.024 <sup>(6)</sup> ± 0.0017	r <sup>2</sup> = 0.98
r <sub>K</sub>	(d <sup>-1</sup> )	0.028 <sup>(6)</sup> ± 0.0031	r <sup>2</sup> = 0.94

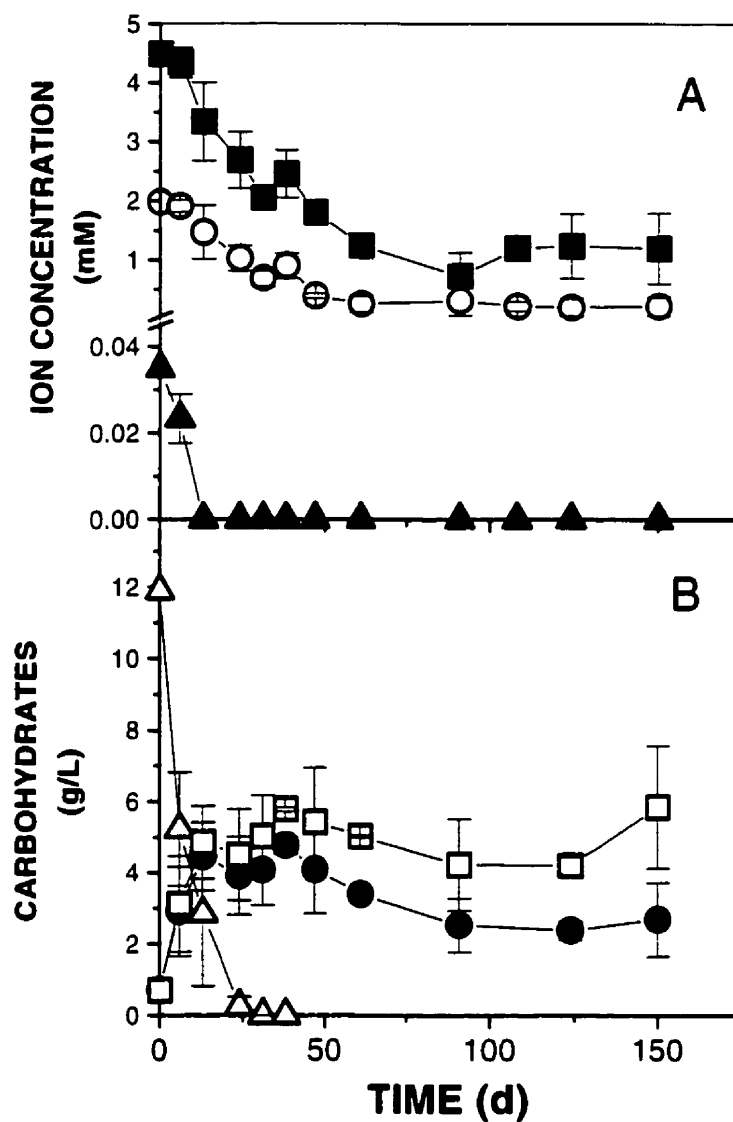
(1) mycorrhized hairy root inoculum dry mass per medium liquid volume  
 (2) harvested to inoculum mycorrhized hairy root dry mass ratio  
 (3) total carbohydrates  
 (4) calculated for the 13 to 48 d period  
 (5) calculated as the mycorrhizal root dry weight produced to the initial phosphate content of the culture medium  
 (6) calculated for the 13 to 48 d period  
 Errors are 95% confidence intervals (SE)

The quantity of new lateral roots was much lower than normally seen on solid M medium cultures (not shown). Maximum biomass was reached 77 days after inoculation which coincided with cessation of nitrate and potassium uptake (Figure 2.3A) and resulted in a maximum growth index of  $2.16 \pm 0.43$  (Table 2.1) which declined somewhat thereafter. The wet-to-dry (W/D) biomass ratio of  $9.85 \pm 0.10$  was similar for all cultures after removal of the liquid retained on root surfaces. Without removal of this liquid, the W/D ratio was artificially high between 17 and 32 depending on handling procedures. No significant difference was observed between the Petri dish and airlift bioreactor.

Phosphate was the only measured nutrient observed to be depleted (within experimental error) from the medium, which occurred within the first 10 days (Figure 2.3A). Nitrate and potassium ions were partially consumed at similar specific uptake rates than roots specific growth rate (Table 2.1), indicating a growth related uptake.

Sucrose hydrolysis occurred within 24 days from inoculation (Figure 2.3B), with glucose being preferentially consumed over fructose. Carbohydrates were not limiting in any culture, including bioreactors. A biomass yield of  $0.39 \text{ g DW} \cdot \text{g}^{-1}$  carbohydrates was observed with respect to total carbohydrate consumption.

Roots remained mycorrhized throughout the culture duration, as 25 to 50% of total root length contained hyphal structures although a negligible amount of vesicles were



**Figure 2.3** Nutrient consumption in Petri dish liquid cultures for an inoculum of  $0.60 \pm 0.11$  g DW  $\cdot$  L $^{-1}$  medium. A, Major ions. ■, Nitrate. ○, Potassium. ▲, Phosphate. B, Carbohydrates. □, Fructose. ●, Glucose. Δ, Sucrose. Each point is the average of three cultures. Error bars are standard deviations.



present (Table 2.2). Intra-root propagule viability was confirmed by new hyphae emerging from 33% of harvested root pieces when placed on fresh medium. Spore formation followed following inoculation. The quantity of new lateral roots was much lower than normally seen on mycorrhized root growth. Average spore production could be described by an exponential (Figure 2.2B) since *G. intraradices* produce their new spores in parallel to growth and branch formation (Chabot et al., 1992). A specific spore production rate of  $0.035 \text{ d}^{-1}$  was found in the exponential phase. A maximum of  $2.51 \times 10^6 \pm 9.86 \times 10^4 \text{ spores} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW inoculum} \cdot \text{L}^{-1} \text{ medium}$  or  $600 \pm 230$  spores per Petri dish were produced after 83 days (Figure 2.2 and Table 2.2). An average of 60% of harvested spores were viable (Table 2.2).

### 2.5.2 Airlift Bioreactor Cultures

A key factor of this type of dual culture concerns the particular growth and proliferation patterns of each symbiotic partner with respect to the objective of the bioprocess under development, namely the production of viable endomycorrhizal propagules (spores, hyphae and intra-root vesicles). In this context, bioreactor cultures were carried out to determine the best inoculation conditions favouring both mycorrhized hairy root growth and AM fungi propagule production. Hairy root inoculum-to-medium volume ratios from 0.13 to  $1.51 \text{ g DW} \cdot \text{L}^{-1} \text{ medium}$  were assessed.

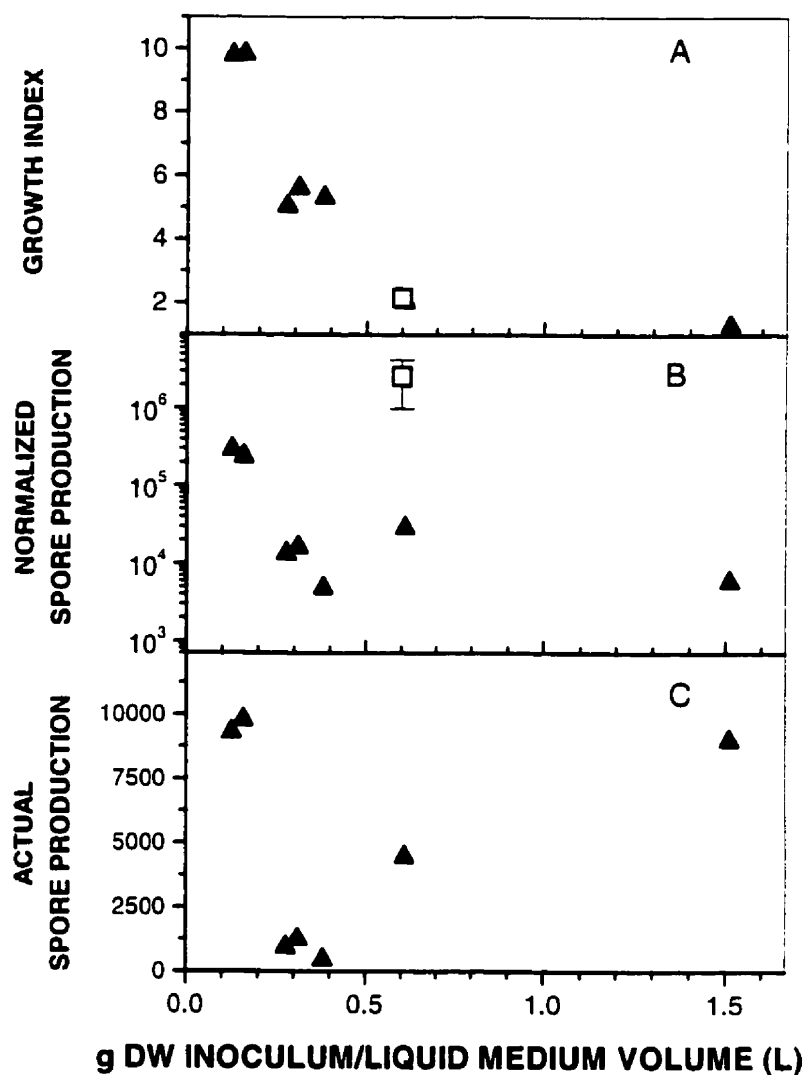
**Table 2.2** *Glomus intraradices* propagules production process performances

<u>Culture method</u>	<u>Host plant</u>	<u>Spore production</u> #/plant % germination	<u>Root mycorrhization</u> % colonization % germination	<u>Time</u> (weeks)	<u>References</u>
Aeroponic	Bahia grass	NA NA	50% NA	12	Sylva and Hubbel (1986)
Aeroponic	Bahia grass	630 NA	17-28% NA	12-14	Hung and Sylva (1988)
Aeroponic	Sweet potato	4 500 NA	21% NA	12-14	
Pot (sand)	Linseed	NA NA	75% 80%	13 13	Dugassa (1995)
Hydroponic					
Dual compartment <sup>(1)</sup> Pétri dish	Carrot hairy roots	# / L of M medium 500 000 67%	NA	16	St-Arnaud et al. (1996) Fortin et al. (1996)
Pétri dish (liquid) <sup>(2)</sup>	Carrot hairy roots	30 000 ± 11 500 60%	25-50%	12	This work
Airlift bioreactor <sup>(3)</sup>	Carrot hairy roots	12 400 ± 800 58%	25-75%	12	"
<p>(1) actual spore production in a two-compartment Pétri as described by St-Arnaud et al. (1996) and Fortin et al. (1996)</p> <p>(2) actual spore production in a standard Pétri dish filled with 0.02 L liquid M medium and 0.015 g DW inoculum</p> <p>(3) actual spore production in a 1-L air-lift bioreactor filled with 0.5 L liquid M medium and 0.065 g DW inoculum</p> <p>(4) harvested mycorrhized hairy root pieces of 0.01 m inducing new extra-root hyphae growth</p> <p>Error data are 95% confidence interval values</p>					

The bioreactor cultures performed using inocula from 0.13 to 0.61 g DW•L<sup>-1</sup> mycorrhizal *D. carota* hairy roots grew well with growth indices from 9.8 to 2.0 respectively, after 107 and 83 days (Figure 2.4A). Roots showed fine elongation but fewer lateral branches than found in Petri dish liquid cultures. New root apices were well distributed throughout the liquid volume and even above the liquid surface. Apparently, the downward medium circulation in the annulus region induced by gas bubbling failed to counterbalance the transformed roots' negative geotropism. Dissolved oxygen concentration remained over 80% of air saturation for all airlift cultures.

An increase in the inocula to 1.5 g DW•L<sup>-1</sup> medium resulted in a decrease of the growth index to 1.28 after 83 days. A critical inoculum concentration of ~0.6 g DW•L<sup>-1</sup> medium was thus observed, above which the growth of mycorrhized hairy roots was significantly limited (Figure 2.4A). This inoculum ratio range was termed the high inoculum range. Lowering the inoculum ratio yielded increasing biomass growth indices (harvested root DW•inoculum DW<sup>-1</sup>).

Normalized (Figure 2.4B) and actual spore productions (Figure 2.4C) behaved differently with respect to inoculum ratio. Normalized spore productions were found to be inversely proportional to the inoculum ratio. Low inocula conditions yielded  $1.82 \times 10^5 \pm 2.86 \times 10^4$  (SEM) spores produced•g<sup>-1</sup> DW inoculum•L<sup>-1</sup> medium as compared to a value of  $2.06 \times 10^4 \pm 8.63 \times 10^3$  (SEM) for the high inocula range.



**Figure 2.4** Effect of inoculating conditions on symbiont growth in submerged cultures. A, Mycorrhized *Daucus carota* hairy root growth index (as described in Figure 2.2). B, Normalized spore production (as described in Figure 2.2). C, Actual spore production per culture volume. □, Petri dish cultures. ▲, Airlift bioreactor cultures.

Conversely, average actual productions seemed to be independent of inocula conditions with  $5.03 \times 10^3 \pm 4.26 \times 10^3$  (SD). However, spore productions obtained in the airlift bioreactor were significantly lower than Petri dish cultures with  $2.51 \times 10^6 \pm 9.86 \times 10^4$  (SEM) spores $\bullet$ g $^{-1}$  DW inoculum $\bullet$ L $^{-1}$  medium (Figure 2.3B). The biomass yield on phosphate for low inocula was higher than for Petri dish cultures with  $33.6 \pm 2.5$  g DW $\bullet$ mM $^{-1}$  PO $_4$  as compared to  $25.71 \pm 3.88$  g DW $\bullet$ mmol $^{-1}$  PO $_4$  (Table 2.1) while decreasing to 15 g DW $\bullet$ mM $^{-1}$  PO $_4$  for an inoculum of 1.5 g DW $\bullet$ L $^{-1}$ .

The roots remained mycorrhized within 25-75% of their length (Table 2.2) showing negligible vesicle content. The quality of the propagules produced was similar to those from Petri dishes with a spore germination level of 58%, and 30% of harvested root pieces showed new hyphal growth when re-cultured on fresh medium.

## 2.6 DISCUSSION

### 2.6.1 Growth of Mycorrhized Hairy Roots in Submerged Cultures

This work focused on investigating the performance of an airlift bioreactor, that could be scaled up to industrial size, for the production of endomycorrhizal propagules. Culture conditions in the airlift system resulted in the growth of a low density root bed that did not result in medium channelling and stagnation, as observed by McKelvey et

al. (1993) for compact root beds, nor favoured, unfortunately, high root-to-root contact. Mycorrhized hairy roots grew well, following an inverse relationship between the growth index and the inoculum concentration (Figure 2.4A). However, problems of non-homogeneous medium distribution with high root bed densities leading to insufficient nutrient renewal zones have been shown in bioreactor cultures (Whitney, 1992). An important culture parameter is thus the nutrient refreshment rate to the root biomass (DiIorio et al., 1992) in order to support the requirements of metabolic activity. However, the similar growth indices obtained in Petri dish and airlift bioreactor for similar inocula suggests that this problem did not occur. Non-homogeneous medium distribution may also be involved in the growth inhibition of high inocula cultures, but the suddenness of the effect (Figure 2.4A) is not likely to be due to hydrodynamic and mass transfer limitations. Plausible reasons for this sudden cessation are insufficient levels of nutrients to favour growth or a possible inhibitory level of root exudates under high inocula conditions. It is well known that a minimal root inoculum mass is required to initiate new cultures (Mosse and Hepper, 1975) but, unfortunately, no studies have been reported on the effect of very high levels of inocula.

The specific biomass growth rate observed in this study was significantly lower than that reported by Taya et al. (1989) ( $0.24 \text{ d}^{-1}$ ) for non-mycorrhized *D. carota* hairy root cultures in an airlift bioreactor using MS medium (3% sucrose). This can be explained by the use of different *D. carota* root lines and medium as well as the effect of

mycorrhization. The lower sugar and salt concentrations of the M medium have been shown to lower the growth rate of strawberry hairy roots in shake flask cultures from  $0.16 \text{ d}^{-1}$  to  $0.05 \text{ d}^{-1}$  (calculated from Nuutila et al., 1995). Furthermore, the presence of the AM fungi within the roots may lower growth as observed under field conditions whereby decreased root mass and increased shoot-to-root mass ratio have been reported for mycorrhized plants (Wilson, 1984; Berta et al., 1990).

### **2.6.2 Mycorrhized Hairy Roots Nutrition**

The low salt M medium allowed both symbionts to grow in Petri dish and airlift bioreactor submerged cultures. However, the culture systems and the use of mycorrhizal hairy roots in this study prevented characterizing separately the major nutrient requirements and uptakes of each symbiotic organism since both grew simultaneously with intracellular nutrient exchanges between symbionts. Therefore, the uptake rates and biomass yields discussed in this study are overall values. Use of overall values may explain the high variability in the specific uptake rates of nitrate and potassium which are generally related to growth (Lee, 1982; Lefebvre and Glass, 1982; Clarkson and Hanson, 1980). Moreover, Petri dish cultures showed a lower phosphate (-23%) biomass yield than that observed for airlift cultures (Table 2.1). Biomass yield with respect to total carbohydrates presented a lower value ( $0.39 \text{ g DW} \cdot \text{g}^{-1}$ ) for Petri dish using mycorrhized hairy roots than the generally accepted value of  $0.5 \text{ g DW} \cdot \text{g}^{-1}$  carbohydrates for a variety of uncolonized hairy root

lines regardless of the culture system and medium (Uozumi and Kobayashi, 1994; Uozumi et al., 1993). These results may also suggest a more important maintenance contribution on global nutrition at higher initial biomass concentrations. This is currently under investigation.

Complete uptake (within experimental error) of phosphate before the end of biomass growth was expected since this has already been reported for strawberry hairy root (Nuutila et al., 1995) as well as undifferentiated plant cell suspensions (Jolicoeur et al., 1992) cultures. Subsequent growth is driven from cytosolic and vacuolar phosphate stores (plants: Ashihara and Tokoro, 1985; Bielecki, 1973; fungi: Harrison and van Buuren, 1995; Beever and Burns, 1980). Root growth and propagule production stopped at the depletion of a limiting nutrient, likely intracellular phosphate, as evidenced by simultaneous cessation of nitrate, potassium and carbohydrate uptake.

### **2.6.3 AM Fungi Propagule Production**

The Petri dish and airlift bioreactor systems used in this study were not detrimental to the mycorrhizal state of inoculated endomycorrhized *Daucus carota* hairy roots. Root colonization was confirmed by staining and growth of external hyphae from root pieces cultured on fresh medium. Airlift cultures yielded root colonization increases, from 10-50% for the inoculated biomass to final levels of 25-75%, which approach



those obtained (75-80%) using linseed as host plant for pot and hydroponic cultures (Dugassa et al., 1995) (Table 2.2). Furthermore, the intra-root propagules produced in the Petri dishes were of the same quality (viability) as those from airlift bioreactors with 33% and 30% of the harvested root pieces showing new hyphal growth respectively. Moreover, internal fungal growth was mainly limited to hyphal and arbuscular structures with few vesicles distributed in 5-10% of total root length. Thus, submerged cultures (Petri dish and airlift bioreactor) showed no significant increases in intra-root fungal vesicle levels as compared to inocula (Table 2.2), which suggest that this condition did not stimulate the AM fungus *Glomus intraradices* to intensively colonize the carrot hairy roots.

Harvested spores in Petri dish and airlift bioreactors were all of the same quality, with germination rates of 58 and 60% respectively. However, the significant difference observed in production levels between these two culture systems may be related to their respective culture conditions which mainly differed in hydrodynamic conditions, root-to-root contact level and gas phase renewal rate. In the case of the airlift system, continuous liquid circulation may have been inhibitory to fungal growth as this organism usually grows under static conditions in soil. Furthermore, in high inocula culture conditions the roots may have produced excessive root exudates which are suspected to adversely affect spore formation (St-Arnaud et al., 1996). Similarity level of culture conditions with the symbionts natural niche (climate, soil quality, etc) may also be important parameters to consider.

During this study, significant variations in spore production and colonization levels were observed for Petri dish and airlift bioreactor cultures (Figure 2.4B, C). Similar results have been reported for the mass production of *Glomus intraradices* inocula using entire plants (Table 2.2). The heterogeneity of mycorrhized root inocula may be involved in this phenomenon. However, the use of higher inocula levels in bioreactors which should have decreased inoculum variability between cultures failed to overcome this problem of production variability (Figure 2.4B, C). A different approach may consist of selecting inocula of better quality by carefully controlling important growth parameters such as root age and colonization level, fungal mass and symbionts physiological state and culture process nutritional status. Finally, another important parameter that needs to be considered is host plant/fungal compatibility (Gianinazzi-Pearson, 1984; Smith, 1980). This is evidenced by differences in spore production and colonization levels between sweet potato and bahia grass in aeroponic culture (Table 2.2) suggesting that carrot hairy roots may not be the optimal host plant to use for *Glomus intraradices* propagule production.

In comparing various technologies for spore production, Petri dish cultures appear to be a simple and efficient solution for laboratory-scale production levels. The fungal material is easy to harvest and free of contaminants. In this context, the dual compartment Petri dish system developed by Fortin et al. (1996) (see also St-Arnaud et al, 1996) represents a suitable approach. This simple system displayed spore production of more than ten times those observed for the Petri dish cultures using

liquid M medium discussed in this study. For industrial scale production, however, these small systems clearly will be insufficient to meet world market demand at reasonable prices. Results from this work showed that this co-culture technology can also be carried out using conventional airlift bioreactor configuration which allowed significant fungal propagule production. To our knowledge, this is the first time that a second generation endomycorrhizal propagule production process in bioreactor offering valuable scale-up potential that can eventually be considered for large industrial scale production is presented. However, more work has to be done on the culture process to overcome present optimal operating conditions with respect to the spore production requiring low inocula levels and longer culture times to reach maximum values.

## **2.7 ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Bio-Capital Inc. and Premier Tech Ltd for their financial and scientific participation and help. Particularly, we would like to thank M.J. Santoiere, L. Nantais and L. Lavoie for their technical help and A. Bitton for reviewing this document.

## 2.8 REFERENCES

- Ashihara H., Tokoro T. 1985. Metabolic fate of inorganic phosphate absorbed by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. J. Plant Physiol. 118: 227-233.
- Andrade G., Mihara K.L., Linderman R.G., Bethlenfalvay G.J. 1997. Bacterial from rhizosphere and hydrosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. Plant Soil 192: 71-79
- Arora D.K., Rai B., Mukerji K.G., Knudsen G.R. 1991. Handbook of Applied Mycology. Volume 1: Soil and Plants. Marcel Dekker Publisher. New-York. 719 pp.
- Bécard G., Fortin J.A. 1988. Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri-T-DNA transformed roots. New Phytol. 108: 211-218.
- Bécard G., Piché Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2320-2325.
- Beever R.E., Burns D.J.W. 1980. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi, in Advances in Botanical Research. Vol. 8. H.W. Woolhouse Editor. Academic Press. London (UK). pp. 127-219.

- Berta G., Fusconi A., Trotta A., Scannerini S. 1990. Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E<sub>3</sub> in the root system of *Allium porrum* L. New Phytol. 114: 207-215
- Bethlenfalvay G.J. 1992. 1. Mycorrhizae and Crop Productivity, in Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. A.S.A Special Publication. 54: 1-27.
- Bieleski R.L. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Annu. Rev. Plant Physiol. 24: 225-252.
- Brundrett M.C., Piché, Y., Peterson R.L. 1984. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Can. J. Bot. 62: 2128-2134.
- Chabot S., Bécard G., Piché Y. 1992. Life cycle of *Glomus intraradices* in root organ culture. Mycologia 84: 315-321.
- Clarkson D.T., Hanson J.B. 1980. The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Physiol. 31: 239-298
- DiIorio A.A., Cheetham R.D., Weathers P.J. 1992. Growth of transformed roots in a nutrient mist bioreactor: reactor performance and evaluation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 457-462.

Dugassa D.G., Grunewaldt-Stöcker G., Schönbeck F. 1995. Growth of *Glomus intraradices* and its effect on linseed (*Linum usitatissimum* L.) in hydroponic culture. *Mycorrhiza* 5: 279-282.

Fortin J.A., St-Arnaud M., Hamel C., Chavarie C., Jolicoeur M. 1996. Aseptic in vitro endomycorrhizal spore mass production. U.S. Patent 5,554,530.

Gianinazzi-Pearson V. 1984. Host-fungus specificity, recognition and compatibility in mycorrhizae, in *Plant Gene Research: Genes involved in microbe-plant interactions*. D.P.S. Verma and T.H. Hohn editors. Springer-Verlag. New-York. pp 225-253.

Hall I.R. 1978. Soil pellets to introduce vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi into soil. *Soil Biol. Biochem.* 11: 85-86.

Harrison M.J., van Buuren M., 1995. A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* 378: 626-629.

Hilton M.G., Rhodes M.J.C. 1990. Growth and hyoscyamine production of hairy roots cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 132-138.

Hung L.L.L., Sylvia D.M. 1988. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 353-357.

Jolicoeur M., Chavarie C., Carreau P.J., Archambault J. (1992) Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. *Biotech. Bioeng.* 39: 511-521.

Khasa P., Furlan V., Fortin J.A., 1990. Effets de différentes espèces de champignons endomycorhiziens sur la croissance de dix espèces de plantes tropicales au Zaïre. *Tropicultura* 8: 159-164.

Kondo O., Honda H., Taya M., Kobayashi T. 1989. Comparison of growth properties of carrot hairy root in various bioreactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 292-294.

Lee RB. 1982. Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. *Ann. Bot.* 50: 429-449.

Lefebvre D.D., Glass A.D.M. 1982. Regulation of phosphate influx in barley roots: Effects of phosphate deprivation and reduction of influx with provision of orthophosphate. *Physiol. Plant* 54: 199-206

McKelvey S.A., Gehrig J.A., Hollar K.A., Curtis WR. 1993. Growth of plant root cultures in liquid and gas-dispersed reactor environments. *Biotechnol. Prog.* 9: 317-322.

Mosse B., Hepper C. 1975. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiological Plant Pathol.* 5: 215-223.

Mosse B., Thompson J.P. 1980. Production of endomycorrhizal inoculum by Nutrient Film Technique (NFT). U.K. Patent # GB 2 043 688.

Mosse B., Thompson J.P. 1984. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. Can. J. Bot. 62: 1523-1530.

Mugnier J., Mosse B. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. Phytopathol. 77: 1045-1050.

Newsham K.K., Fitter A.H., Watkinson AR. 1995. Multi-functionnality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. TREE 10: 407-411.

Nuutila A..M., Vestberg M., Kauppinen V. 1995. Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch.) with arbuscular mycorrhizal fungus. Plant Cell Reports 14: 505-509.

Ramakrishnan D., Salim J., Curtis W.R. 1994. Inoculation and tissue distribution in pilot-scale plant root culture bioreactors. Biotechnol. Techniques 8: 639-644.

Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y., Bocard G., Rolin D., Douds D.D. jr. 1998 Nutrient transport and metabolism in the life cycle of arbuscular mycorrhizae as examined by NMR spectroscopy. In : Radical Biology. H.E. Flores, J.P. Lynch and D. Eissenstat Editors. Am. Soc. of Plant Physiol., Rockville, Maryland, USA. Vol. 18. pp. 178-187.



St-Arnaud M., Hamel C., Caron M., Fortin J.A. 1994. Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. Can. J. Plant Pathol. 16: 187-194.

St-Arnaud M., Hamel C., Vimard B., Caron M., Fortin J.A. 1995. Altered growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* in an in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. Mycorrhiza 5: 431-438.

St-Arnaud M., Hamel C., Fortin J.A. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. Mycol. Res. 100: 332-338

St-Arnaud M., Hamel C., Vimard B., Caron M., Fortin J.A. 1997. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the non-VAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. Can. J. Bot. 75: 998-1005.

Simon L., Bousquet J., Lévesque R., Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature 363: 67-69.

Smith S.S.E. 1980. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. Biol. Rev. 55: 475-510.

Sylvia D.M., Hubbell D.H. 1986. Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. *Symbiosis* 1: 259-267.

Sylvia D.M., Jarstfer A.G. 1990. Sheared roots as a VA-Mycorrhizal inoculum and methods for enhancing plant growth, United States Patent # 5,096,481.

Sylvia D.M., Jarstfer A.G. 1992. Sheared roots inocula of vesicular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 229-232.

Taya M., Yoyoma A., Kondo O., Kobayashi T., Matsui C. 1989. Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors. *J. Chem. Eng. Japan.* 22: 1, 84-88.

Takizawa N., Takayama S. 1994. The method and culture system for large scale culture of plant roots using aeration-agitation bioreactor: strategies to scale-up. Abstracts of the VIII<sup>th</sup> International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Florence, Italy. 12-17 June. p. 263.

Toivonen L. 1993. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. *Biotechnol. Prog.* 9: 12-20.

Trappe J.M., Molina R., Castellano M. 1984. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. *Ann. Rev. Phytopathol.* 22: 331-359.

Uozumi N., Kobayashi T. 1994. Application of Hairy Root and Bioreactors. Advances in Plant Biotechnology. Ryu and Furusaki editors. Elsevier. pp.307-337.

Uozumi N, Kohketsu K, Kobayashi T. 1993. Growth and kinetic parameters of *Ajuga* hairy root in fed-batch culture on monosaccharide medium. J. Chem. Tech. Biotechnol. 57: 155-161.

Whitney P.J. 1992. Novel bioreactors for the growth of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Enzyme Microbiol. Technol. 14: 13-17.

Wilson P.D.G., Hilton M.G., Meehan P.T.H., Waspe C.R., Rhodes M.J.C. 1990. The cultivation of transformed roots from laboratory to pilot plant, Current plant science and biotechnology in agriculture. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas and J. Van Aartrijk editors. Kluwer Academic Publishers. pp. 700-705.

Wilson JM. 1984. Comparative development of infection by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol 97: 413-426

Wood T, Cummings B. 1992. Biotechnology and the future of VAM commercialization, in Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. ASA Special Publication 54: 468-487.

Zobel R.W., Dei Tredici P., Torren J.G. 1976. Method for growing plants aeroponically. *Plant Physiol.* 57: 344-346.

### CHAPITRE III

## INTRACELLULAR pH IN AM FUNGI: A SYMBIOTIC PHYSIOLOGICAL MARKER

Une technique de mesure en temps réel du pH cytosolique de champignons endomycorhiziens en culture a été développée avec l'utilisation d'un colorant (BCECF-AM) et de mesures ratiométriques (excitation à 490/450 nm). L'étude a été principalement effectuée en utilisant des résultats photométriques, bien que certains résultats ont été confirmés par analyse d'images. L'utilisation de nigéricine a permis d'établir une courbe de calibration in vivo. Les paramètres expérimentaux tels le temps de prise en charge du colorant et la concentration en colorant extracellulaire ont été déterminés afin d'effectuer les mesures pH en régime établi sur des cellules vivantes. Un pH caractéristique a été observé le long des hyphes. Pour *Gigaspora margarita*, le pH de l'apex (0 – 2  $\mu\text{m}$ ) a été typiquement de 6,7, augmentant abruptement à 7,0 derrière cette région (9,5  $\mu\text{m}$ ), et diminuant sur les 250  $\mu\text{m}$  suivants vers une valeur constante de 6,6. Un patron similaire a été obtenu avec *Glomus intraradices*. Le profil pH de tubes germinatifs de *G. margarita* a été plus élevé lorsque cultivés en présence de racines de carotte transformées (*Daucus carota*) non-mycorhiziennes. De façon similaire, des hyphes extraracinaires de *G. intraradices* ont montré un profil pH apical supérieur à celui de tubes germinatifs. L'usage d'une

membrane de papier empêchant les racines mycorrhizées d'entrer en contact direct avec le milieu de culture a favorisé un pH des hyphes encore plus élevé. Les résultats suggèrent que cette technique pourrait être utilisée à titre d'un bioessai pour l'étude de la perception de signaux et/ou les phénomènes de  $H^+$ /co-transport de nutriments par les champignons endomycorhiziens.

Cet article a été publié dans : *Plant Physiology* (1998), **116**, 1279-1288.

**MANUSCRIT #2****INTRACELLULAR pH IN AM FUNGI: A SYMBIOTIC  
PHYSIOLOGICAL MARKER**

**JOLICOEUR, Mario<sup>1,2</sup>, Sophie GERMETTE<sup>2</sup>, Martin GAUDETTE<sup>1</sup>, Michel  
PERRIER<sup>1</sup>, Guillaume BÉCARD<sup>2\*</sup>**

*1 BIOPRO Research Center, École Polytechnique de Montréal, Chemical Engineering Dept., 2900 Édouard-Montpetit, Montréal, Québec, Canada, C.P. 6079, Succ. Centre-Ville, H3C 3A7.*

*2 Laboratoire de Mycologie Végétale, Université Paul-Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.*

**\* Corresponding Author**

**3.1 FINANCIAL SUPPORT**

Scholarships to M. Jolicoeur and M. Gaudette supporting their stay in Toulouse was provided by the Fonds pour la formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (contract no. 94-CI-0117), and the "Conseil Régional de Midi-Pyrénées", (contract no. 9300417), funded the spectrofluorometric microscope used in this study.

### 3.2 ABBREVIATION

AM, arbuscular mycorrhizal; BCECF, 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(and-6)-carboxyfluorescein; BCECF-AM, acetoxymethyl ester of BCECF.

### 3.3 ABSTRACT

A method was developed to perform real time analysis of cytosolic pH of arbuscular mycorrhizal fungi in culture using BCECF-AM (Molecular Probes) dye under ratiometric measurements (490/450 nm excitations). The study was mainly performed using photometric analysis although some data were confirmed using image analysis. The use of nigericin allowed an in vivo calibration. Experimental parameters such as loading time and concentration of the dye were determined so that pH measurements could be made for a steady-state period on viable cells. A characteristic pH profile was observed along hyphae. For *Gigaspora margarita*, the pH of the tip (0-2  $\mu\text{m}$ ) was typically of 6.7 sharply raising up to 7.0 behind this region (9.5  $\mu\text{m}$ ) and decreasing the next 250  $\mu\text{m}$  to a constant value of 6.6. A similar pattern was obtained for *Glomus intraradices*. The pH profile of *G. margarita* germ tubes was higher when cultured in the presence of *Daucus carota* hairy root (non-mycorrhizal). Similarly, extraradical hyphae of *G. intraradices* had a higher apical pH than the germ tubes. The use of a paper layer, preventing the mycorrhizal roots to be in direct contact with the medium,



selected hyphae with an even higher cytosolic pH. Results suggest that this method could be useful as a bioassay for studying signal perception and/or H<sup>+</sup> co-transport of nutrient by arbuscular mycorrhizal hyphae.

### 3.4 INTRODUCTION

Arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi are obligate biotrophs living symbiotically with plants since the beginning of terrestrial plant evolution (Simon et al., 1993; Taylor et al., 1995). This common history of a mutualistic relationship is remarkably long. Thus the partners have developed a high degree of interdependency (Smith and Gianinazzi-Pearson, 1988). Specific signals are exchanged as part of a subtle and complex cellular and molecular communication between the partners (Koide and Schreiner, 1992; Bonfante and Perotto, 1995).

At the early stages of fungal development, compounds such as CO<sub>2</sub> and/or plant root exudates, related to the environment, have been shown to stimulate spore germination and hyphal growth (Elias and Safir, 1987; Bécard and Piché, 1989a,b; Gianinazzi-Pearson et al., 1989; Nair et al., 1991; Giovannetti et al., 1993a,b). Since the germ tube has to recognize and reach the potential host root, signal compounds exuded from the root are also thought to be involved in the induction of specific morphological structures characterized by a distinctive hyphal branching (Giovannetti et al., 1993b).

These structures have been called "arbuscule-like structure" and "pre-infection fan-like structure" by Mosse and Hepper (1975) and by Powell (1976), respectively. They may be necessary for the differentiation of appressoria on the root surface from secondary apices. The subsequent fungal penetration and colonization of the root are crucial steps to ensure fungal survival as the germ tube autonomy is mainly limited by the carbon reserves of the propagule (Bécard and Piché, 1989a). These steps involve complex and intimate cellular and molecular events (Bonfante and Perotto, 1995), here also partially under the control of the plant. Regarding the extraradical phase, it has also been observed that fungal growth and spore production could be stimulated when occurring far from the roots as shown in the dual compartment Pétri dish culture system for *Glomus intraradices* and *Glomus aggregatum* on *Daucus carota* hairy roots (St-Arnaud et al., 1996). These observations suggest that host roots can also produce and release in the environment some chemicals inhibiting spore formation. Thus, the entire life cycle of AM fungi from spore germination to spore production is under the control of regulatory compounds of plant origin.

Published studies on AM fungal response to various chemical or plant factors have always used criteria such as hyphal elongation, morphology or propagule production. Days to months were required to record data. The present communication explores the hypothesis that morphological or growth responses of the fungus to any new environment are associated with immediate and observable intracellular events. In this work, we evaluated AM fungi intracellular pH as a potential physiological marker.

The intracellular pH is a key parameter involved in a large number of cellular activities (Kurkdjian and Guern, 1989). In terms of metabolism, pH regulates enzyme activity (Yoshida, 1994) and affects the solubility and transport of solutes through the cytosol (Agutter et al., 1995). In mammalian cells, cytoplasmic pH can be a second messenger (Kurkdjian and Guern, 1989, and references therein). For example, induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation were the result of intracellular pH modulation in hamster embryo cells (Isfort et al., 1993). As the following examples show, similar observations have been made in several organisms belonging to the kingdom fungi. *Saccharomyces cerevisiae* exhibited a direct relationship between its global intracellular pH and viability (Imai and Ohno, 1995). Harold (1994) provided evidence that proton ions could act at fungal apices as "localized signal to trigger cytoplasmic actions". Intracellular alkalization is required for conidiation of *Penicillium cyclopium* (Roncal et al., 1993). Recently, it has been proposed that apical alkaline pH gradients may be integral to hyphal extension in fungi (Robson et al., 1996).

The regulation of intracellular pH mainly depends on the activity of  $H^+$ -ATPases. This proton pumping activity ensures the maintenance of electrochemical proton gradients needed for nutrient uptake in plant and fungal cells. Electrobiological studies on cells growing apically have been used to propose a proton "circuitry" model which generates a characteristic internal pH profile as observed, for example, in

hyphal apices (Harold, 1994, and references therein). This pH profile has been suggested to be maintained by entry of proton ions via  $H^+$  co-transport symports at the tip and by proton excretion by ATPase pumps beyond the tip. Several studies on membrane transport of various nutrients are in agreement with this mechanism (Beever and Burns, 1980; Novak et al., 1990; Brandao et al., 1992).

Recent developments in the use of fluorescent molecules showing high affinity for specific cell constituents (organelles, ions) opened the way to a novel in vivo real time experimental approach (Tsien, 1989). Widely used for mammalian cells studies, these cytochemical probes have greatly helped to understand and describe signal transduction processes (Tsien, 1989; Alberts et al., 1994).

Our objectives were first to develop an in vivo method for measuring intracellular pH in AM fungi using the proton specific cytochemical probe BCECF-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Secondly, different culture conditions or stimulatory states were imposed for the evaluation of intracellular pH as a sensitive physiological marker of living fungal cells.

### 3.5 MATERIALS AND METHODS

#### 3.5.1 Biological Materials

Spores of *Gigaspora margarita* Becker & Hall (DAOM 194757) were obtained from pot cultures with leek plants in Terragreen<sup>TM</sup> (Netco, Paris) mineral substrate. Long-Ashton liquid medium was added weekly. Spores were harvested after 6 to 8 weeks of culture, wet sieved and surface sterilized as described by Bécard and Fortin (1988). Before use they were dispersed on 0.1% MgSO<sub>4</sub> solidified by 0.4 % Phytigel<sup>TM</sup> (Sigma Chemical CO., ST. Louis, MO) and stored at 4°C to prevent spore germination.

Spores of *Glomus intraradices* Schenck & Smith were produced in vitro on *Daucus carota* hairy roots (Bécard and Fortin, 1988). Cultures of *Glomus intraradices* with *D. carota* hairy roots were originally started from soil isolated spores as described by Chabot et al. (1992). Subculture of mycorrhizal roots was performed every 2-3 months by transferring colonized root pieces to fresh solid M medium (Bécard and Fortin, 1988) in one side of two compartment Pétri dishes (9 cm diameter) (St-Arnaud et al., 1996). Pétri dishes were placed in the dark at 26± 1°C. The spores were extracted from the distal side of the two compartment Pétri dishes (St-Arnaud et al., 1996) after 3 to 4 months of culture. The gel was solubilized aseptically in a blender (400 rotations/min) using 0.01 M citrate buffer at pH 6 at 25°C (Doner and Bécard,

1991). The spores were collected in an autoclaved sieve (53  $\mu\text{m}$ ), rinsed 3 times and stored in sterile distilled water at 4°C to prevent spore germination.

### 3.5.2 Cultures

Plastic Pétri dishes of 5 cm diameter filled with 4 mL of solidified (0.25% Phytigel<sup>TM</sup>) M medium (Bécard and Fortin, 1988) were used as culture systems and sample chambers for microscopy. Two to four spores of *Gigaspora margarita* per Pétri dish were placed under sterile condition inside the gel using a scalpel blade. The negative geotropism of *Gigaspora* germ tubes (Watrud et al., 1978) was exploited to direct hyphal growth toward the bottom of the dish. By incubating the dishes -10° from vertical (bottom up), the germ tubes were invariably growing straight, against the plastic bottom of the dishes, in an optimal position for high magnification microscopic observations. Incubations were made in a 2% CO<sub>2</sub> incubator at 32°C. When non-mycorrhizal *D. carota* hairy roots were added, they were placed at the opposite side of the spores so that germ tubes were growing towards them. Spores of *Glomus intraradices* were transferred in similar dishes with a sterile 200  $\mu\text{L}$  pipette. They were then inserted into the gel matrix using a scalpel blade under a binocular installed in a laminar sterile flow hood. The dishes were incubated right side up in the same CO<sub>2</sub> incubator. Experiments on *G. intraradices* extraradical growth were prepared by inoculating, in the 5 cm dishes, a mycorrhizal *D. carota* hairy root of ~2 cm length obtained from dual compartment cultures (St-Arnaud et al., 1996). The

dishes were incubated ( $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) for a minimum of 5 days in order to let the root grow and the fungus form extraradical hyphae. In some experiments, direct contact of the mycorrhizal root with the solid medium was prevented by first laying down a paper filter (#4, Watmann) on the gel. The porosity of the filter was high enough to let extraradical hyphae grow through it.

In one experiment, a 5 mM phosphate buffer was included in the M medium to control external pH of the fungal cultures. It was also added aseptically (in a liquid form) by successive rinsing 4 hours before microscopy observation to impose late pH modifications of the solid culture media.

### 3.5.3 BCECF-AM Dye Loading

BCECF was used in its "cell permeant" form, the acetoxymethyl ester (BCECF-AM). As such, the molecule is non-fluorescent, hydrophobic and has the ability to diffuse freely through the cell membrane. Once inside the cell the acetoxymethyl group is hydrolyzed by some intracellular esterases. The molecule then becomes hydrophilic and fluoresces when excited. From time zero when the dye is added to the dishes, the fluorescence kinetics is the resultant of dye loading in the cell and esterase activities. BCECF-AM stock solutions were prepared at 10 mM (50  $\mu\text{g}$  BCECF-AM in 8.4  $\mu\text{L}$  anhydrous DMSO) and stored at  $-15^{\circ}\text{C}$ . Loading solutions of BCECF-AM were prepared by initially adding 0.8  $\mu\text{L}$  of a Pluronic<sup>TM</sup> F-127 stock solution (20 % in DMSO, Molecular Probes) to 4 mL of liquid M medium. Then, 0.8  $\mu\text{L}$  of the BCECF-

AM stock solution was added to the 4 mL solution and vortexed for 15 s for a BCECF-AM concentration of 2  $\mu\text{M}$ . In the absence of Pluronic, BCECF-AM diffuses poorly throughout aqueous gel. Four mL of the dye solution were added on the gel surface so that BCECF-AM, after equilibrium, was at a final concentration of 1  $\mu\text{M}$ . Experimental conditions were fixed at 1  $\mu\text{M}$  BCECF-AM final to keep a sub-lethal DMSO (1:10<sup>4</sup>, v/v) content. High (1:10<sup>2</sup>, v/v) DMSO contents showed a deleterious effect on hyphal growth. The dishes were then incubated (45 min) upside down for *G. margarita* in the CO<sub>2</sub> incubator to maintain the hyphal tips against the bottom. A modified Pétri dish cover was used to fit in the upside down dishes and prevent any leaks. For *Glomus intraradices* the dishes were normally incubated right side up during staining (45 min). In all cases, dye solutions were kept in the dishes during microscopic measurements to allow continuous loading of the growing cells. This precaution provoked no higher fluorescence background, indicating that no degradation of BCECF-AM or external esterase activity occurred in our experimental conditions.

### 3.5.4 Excitation Lights and Photometric Analysis

A dual source of two monochromators (Amko LTI, Tormesch, Germany) was connected by fiber optics to an inverted microscope (Leitz DMIRB/E, Leika, Wetzlar, Germany). For dual excitation experiments, lights were set at a band width of 2 nm. Appropriate dichroic (510 nm) and barrier (520 nm) filters and excitation (450 and



490 nm) required for the pH indicator BCECF were used to optimize emission light. Emission light intensities were read in counts/s with a photomultiplier connected to a computer which discriminates intensities emitted from both excitation sources (Amko LTI). The photomultiplier was equipped with an adjustable diaphragm to limit emission light measurements to a selected area. This window was generally adjusted to fit into the smallest hyphal diameters (3  $\mu\text{m}$ ), when using a 63x objective (PL Fluotar L 63/0.7). The software (GEM, Amko LTI) was set for one datum sample per second. One observation (data point) represented the average of 10 to 30 consecutive records. Since the fluorescence measurements were made on live elongating cells (1 to 5  $\mu\text{m}/\text{min}$  for *G. margarita*), longer observation times could not be used without experiencing a change in the observed hyphal zone. Excitation spectra of BCECF were obtained with our optical system. They proved to be similar to published data (Handbook of Molecular Probes) with an isoexcitation wavelength of 450 nm and a maximum light emission at 490 nm excitation. Therefore, the two monochromators were set at 450 and 490 nm. The ratios of the corresponding emitted fluorescence, proportional to  $\text{H}^+$  concentrations, were automatically calculated (1 datum/s) by the computer. The conversion into pH values was obtained from the ratiometric calibration curves (see below). The emission signals corresponding to 450 nm excitation were useful data for the experiments of dye loading because they are pH independent.

### **3.5.5 Image Analysis**

Microscopic images (obj. 63x) were acquired with a cooled extended Isis intensified CCD camera system (Photonic Science, Millham, Mountfield, Robertsbridge, East Sussex, TN32 5LA, UK), digitized and analyzed using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, L. P., Silver Spring, Maryland 20910). Fluorescence images at 490 and 450 nm excitations were acquired successively within 10 s. The intensifier gain of the camera control was set using the 490 nm excited images (more fluorescent) to optimize signal to noise ratio and avoid gray level saturation. The average background value of each digitized fluorescence image was calculated and subtracted prior to obtain the ratio image (490 nm/450 nm). Hyphal outlines of ratio images were precisely determined using the corresponding images immediately acquired under visible light. Visually, the pH profile along the hypha was expressed by transforming gray scale of the ratio image into pseudocolors and quantitatively, by showing the average pixel values of a band of 7 pixel columns along the length of the hypha.

### **3.5.6 Ratiometric Signal Calibration**

Transformation of the ratiometric values into pH values was only made for photometrically acquired data. It was obtained in vitro and in vivo. In vitro, an 8 well-chamber slide (of glass) was used, filled with 200  $\mu$ L of a 0.1 M sodium phosphate

buffer and 0.8  $\mu\text{L}$  of a BCECF acid solution (in pure water) for a final BCECF concentration of 1  $\mu\text{M}$ . A range of pH values from 5.17 to 7.95 was imposed.

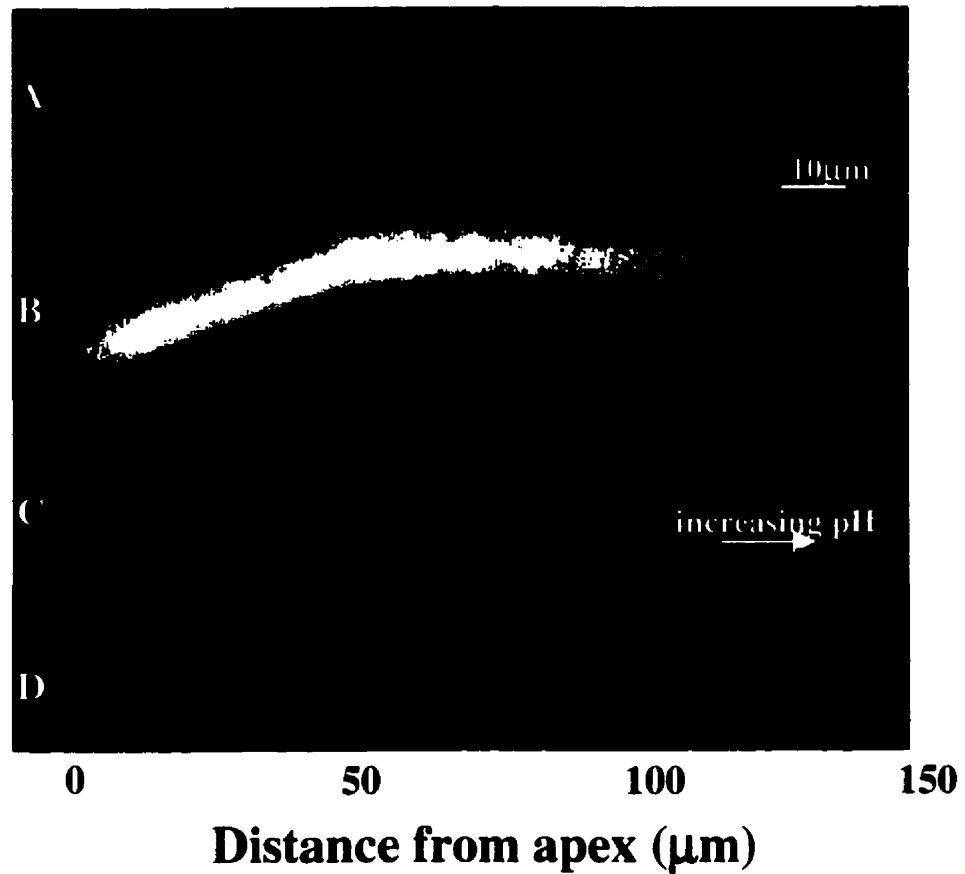
For intracellular (in vivo) signal calibration, the same 8 well-chamber slide was filled with 8x200  $\mu\text{L}$  of liquid M medium, inoculated with 2 to 4 *G. margarita* spores per well, and placed in the CO<sub>2</sub> incubator. Once germ tubes were more than a spore diameter long (i.e. > 200  $\mu\text{m}$ ), 40  $\mu\text{L}$  of a 10  $\mu\text{M}$  BCECF-AM - Pluronic<sup>TM</sup> F-127 solution were added in each cell for staining. After 45 min, 100  $\mu\text{L}$  volume was removed and 200  $\mu\text{L}$  of a 150 mM K<sup>+</sup> phosphate buffer adjusted at the appropriate pH was added in each well. The presence of potassium within the buffer did not modify the desirable pH. After 10 min, pH equilibrium was reached within the liquid medium. Then, 30  $\mu\text{L}$  of a 50  $\mu\text{M}$  nigericin - Pluronic<sup>TM</sup> F-127 solution, a K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> specific ionophore (Pressman, 1976), prepared, as described for BCECF-AM solution, from a 1.5 mM stock solution (in DMSO), was added in each well for a 4.4  $\mu\text{M}$  final concentration. This ionophore clamps intracellular pH to extracellular pH and required potassium ions to be efficient without mortally depolarizing the cell membrane (Pressman, 1976). This procedure minimized the DMSO final content to 0.3% and allowed intracellular pH to stabilize at the extracellular value within 30 min. For extended periods experimental conditions seemed to disorganize in a deadly manner the fungal cell. Calibration experiments made with hyphae growing on solid medium gave similar results.

## 3.6 RESULTS

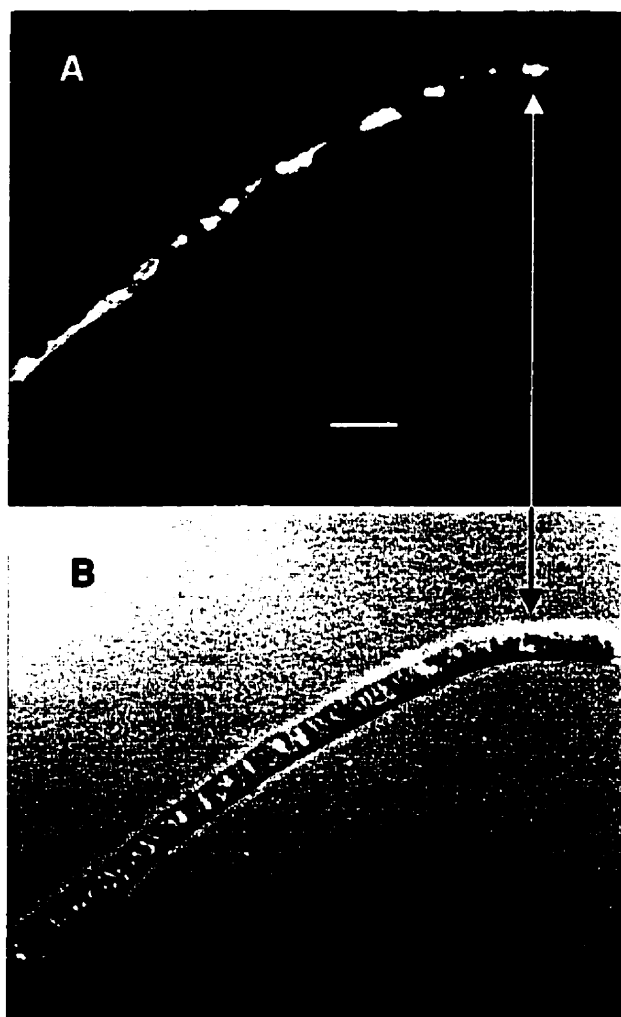
### 3.6.1 Typical Apical Cytosolic pH Profile

For *Gigaspora margarita*, intracellular pH was exclusively measured in the germ tube and for *Glomus intraradices* in the main hyphae since negligible fluorescence was measured at secondary apices. Fungi under investigation did not exhibit any autofluorescence. Under the conditions used, BCECF proved not to alter the viability of hyphae since these could still be growing several days after staining. Healthy and growing hyphae showed diffuse fluorescence at excitation wavelengths 450 and 490 nm indicating absence of dye sequestration (Figure 3.1). In contrast, localized and intense fluorescent spots with pH values of 4 to 5 were visible in senescing hyphae (Figure 3.2). pH measurements were considered to be mainly cytosolic (as presented in the discussion section). Senescence was always associated with a rapid process of necrosis where no more cytoplasmic streaming could be seen along with a brown coloration of the necrotic area. Before senescence of the hyphae was completed, some active cytoplasmic regions within it accumulated the dye. Already dead or non growing hyphae showed no fluorescence; this lack of fluorescence was probably due to the absence of esterase activity. Thus, only uniformly fluorescent hyphae were used for experiments.

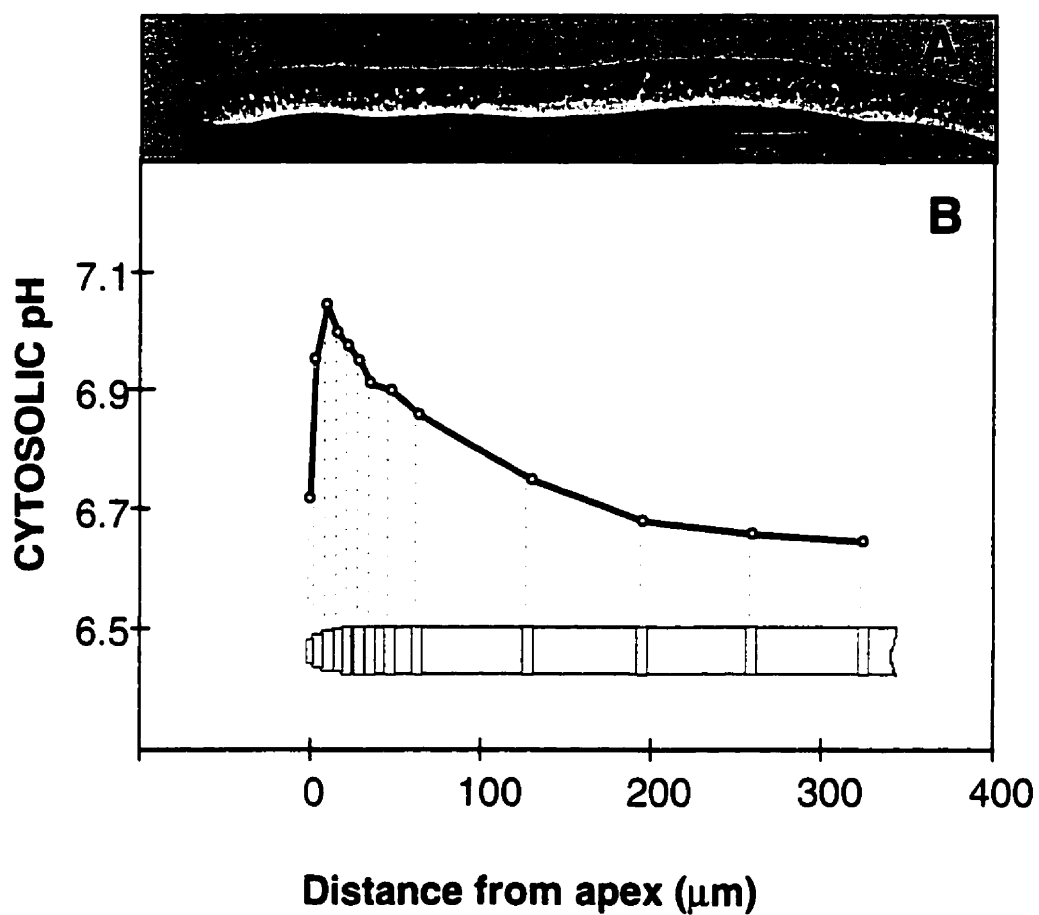
A typical profile of pH distribution could be observed at the apical region of hyphae (Figure 3.3B). This profile was confirmed by image analysis (Figure 3.1). Photometric



**Figure 3.1** Intracellular pH distribution within a growing germ tube of *Gigaspora margarita* loaded with the pH indicator BCECF and measured by fluorescence ratio imaging. A, Fluorescence image at 450 nm excitation. B, Same fluorescence image at 490 nm excitation. C, Ratio of the two previous images (490/450 nm) as a pseudocolor image showing the pH variations along the hypha. D, Same ratio image representing the average pixel values along the length of the hypha; these values are proportional to pH values.



**Figure 3.2** Senescing *Gigaspora margarita* germ tube three hours after BCECF-AM loading in high (lethal) DMSO condition. A, BCECF fluorescence microscopy (450 nm excitation). B, Same hypha obtained by Differential Interference Contrast microscopy. The fluorescence localizes in cytoplasmic area not yet necrosed (arrow). Bar =10  $\mu$ m.



**Figure 3.3** *Gigaspora margarita* germ tubes. A, Image obtained by Differential Interference Contrast microscopy, bar = 10 μm. A group of unidentified organelles is indicated (\*). B, Typical pH profile along the hyphal trunk: dotted lines show corresponding selected photometric reading windows for measurement of the fluorescence emitted by the pH indicator BCECF.

analysis was used in the rest of the study because of its greater sensitivity. At the hyphal tip (first 2  $\mu\text{m}$ ), a relatively acidic pH was always measured. Within the next 9.5  $\mu\text{m}$ , the pH increased rapidly to more alkaline values, then slowly decreased to more acidic values to reach at the plateau (over 200  $\mu\text{m}$  behind the tip) a value close to that of the tip. This characteristic profile has been observed for all hyphae examined. In parallel to this typical pH profile, a characteristic organization of the hyphal tips could be observed for *G. margarita* (*G. intraradices* hyphal tips were too small for accurate observations under visible light). Associated with actively growing hyphae, a group of 10 to 15 spherical organelles (unidentified) of  $\sim 1$   $\mu\text{m}$  diameter (Figure 3.3A) were moving within the cytosol volume and staying between 3 to 25  $\mu\text{m}$  from the apical tip. The acidic region at the tip was always free of these organelles. DAPI staining of living germ tubes showed that these organelles were not nuclei. The first apical nuclei were located 50  $\mu\text{m}$  behind the hyphal tip (data not shown).

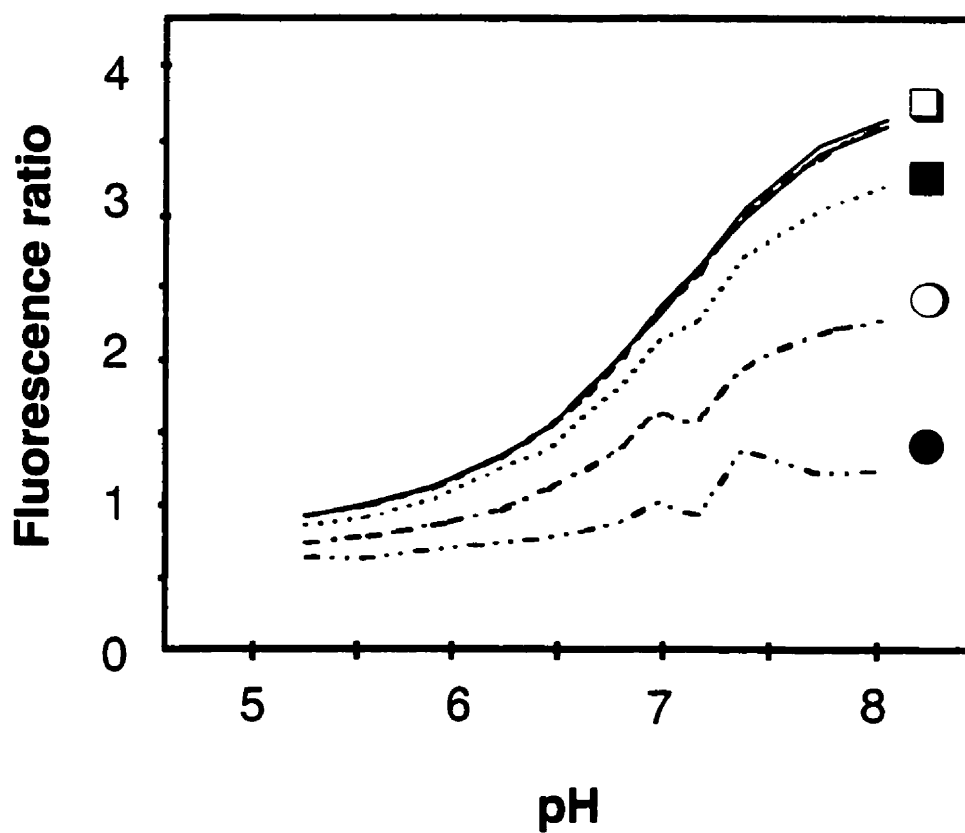


### 3.6.2 Microfluorometric Method Validation

#### 3.6.2.1 Effect of Dye Concentration

Since the tip is the narrowest part of the hypha, in this region, it has a smaller cytoplasmic volume, which results in a lower fluorescence signal. Moreover this region likely accumulates numerous vesicles required for apical growth and as a result contains less cytosol per unit of volume. For these reasons, the apical fluorescence signals (as given at 450 nm) were always the lowest. As a result, pH measurements in the apical region of hyphae had the lowest signal to noise ratio. The acceptable inferior limits for signal to noise ratios were evaluated as follows. Fluorescein solutions were gradually added to Pétri dishes with *G. margarita* germ tubes previously loaded with BCECF-AM to raise artificially the fluorescence background. It was verified that signal to noise ratios over 0.55 were acceptable for reliable measurements and that they were not below this limit at the hyphal tip.

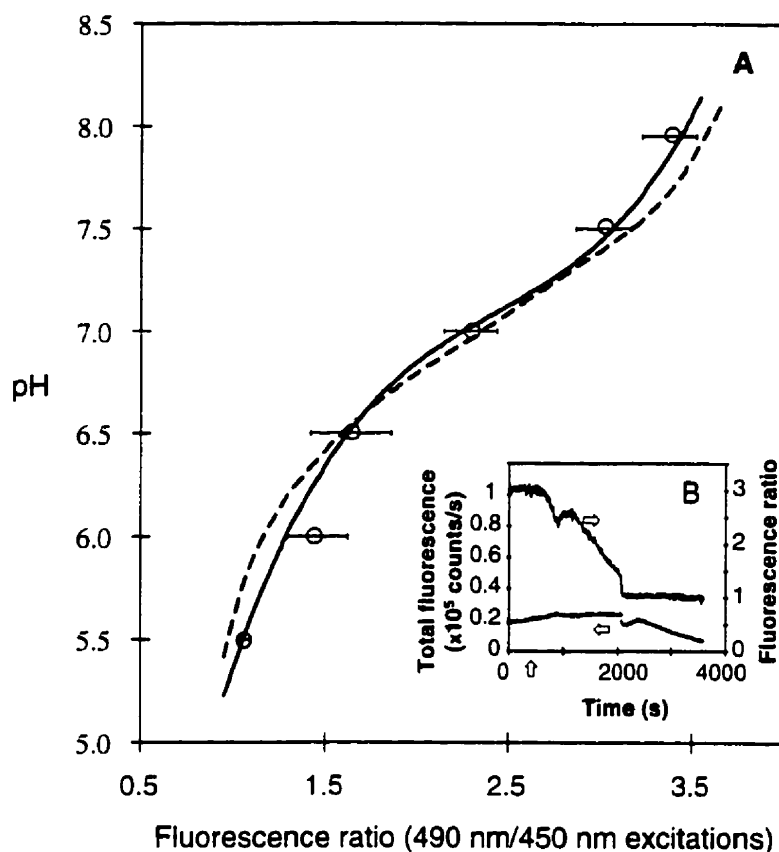
The prerequisite dye concentration for reliable pH measurement was also evaluated. As illustrated in Figure 3.4, in vitro measurements using diluted acidic BCECF in phosphate buffers (pH 5.17 to 7.95) showed that the 490 to 450 nm emission ratios are reliable only for BCECF concentrations of 0.63  $\mu\text{M}$  and above. Below this concentration, the protonated form of BCECF is overestimated, ratios are underestimated and this underestimation increases with dye dilution.



**Figure 3.4** BCECF-AM loading conditions. Fluorescence ratios at 490 and 450 nm excitations of BCECF at varying pH for the following BCECF acid concentrations: 0.01  $\mu\text{M}$  (●), 0.04  $\mu\text{M}$  (○), 0.16  $\mu\text{M}$  (■), and 0.63  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  with the same symbol (□).

### 3.6.2.2 Ratiometric Signal Relationship with Actual pH

The in vitro and in vivo calibration curves were similar for the physiological pH range of 6.5-7.5 as illustrated in Figure 3.5A. Deviations observed outside this range could be attributed to some cytosolic buffering capacity. Addition of the phosphate buffer with 150  $\mu$ M KCl seemed to disorganize the fungal cell since the characteristic unidentified spherical organelles were no longer concentrated at the apical region (as normally observed for an healthy *G. margarita* growing hyphae). However, no internal signs of cell death occurred before the ionophore addition. Once in contact with the ionophore, hyphal progressive necrosis mainly happened when the external and cytosolic pH were at equilibrium for acidic pH values. Figure 3.5B illustrates a characteristic and reproducible early cell reaction following the addition of nigericin (external pH 5). While intracellular pH decreases slowly, it shows a characteristic transient raise. These cytosolic pH variations were not due to dye bleaching nor leaking, as the 450 nm emission fluorescence signal did not significantly change throughout experiments.

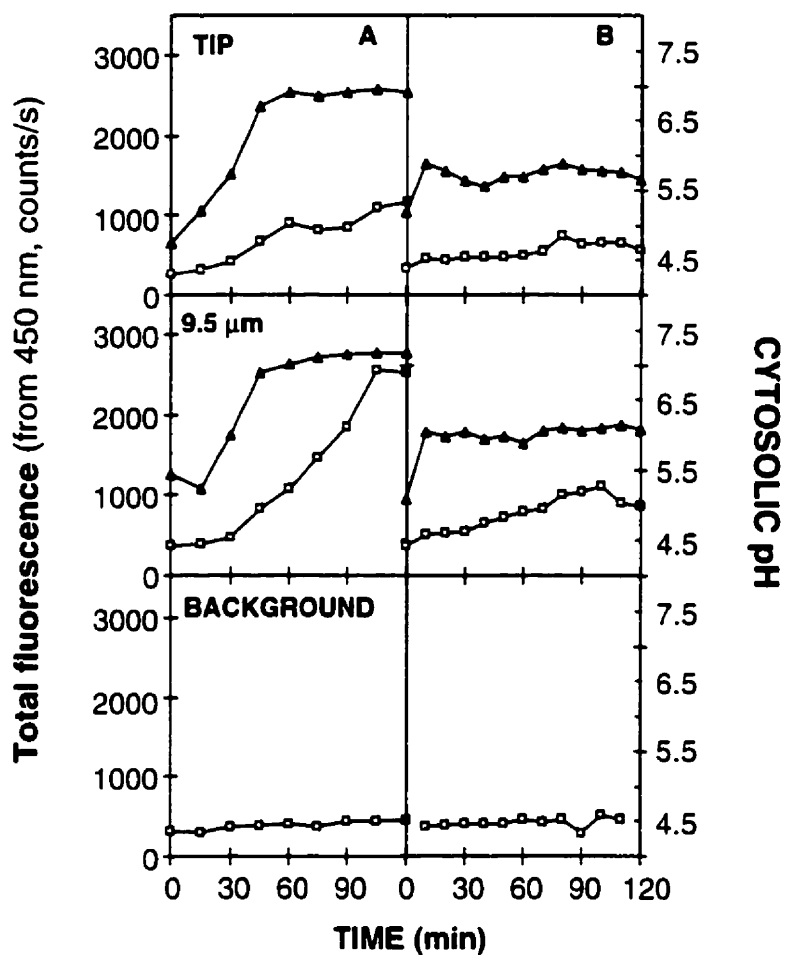


**Figure 3.5** Fluorescence signal calibration. A, pH calibration curves: in vitro calibration showing measurements of fluorescence ratios (for 490 and 450 nm excitations) of 1  $\mu$ M BCECF in sodium phosphate buffer at various pH (---), in vivo calibration showing the same fluorescence ratios measured in *Gigaspora margarita* germ tubes (—) (experimental mean values ( $n=4$  to 6):  $\circ$ , with corresponding standard error bars) at varying external pH in the presence of 1  $\mu$ M BCECF-AM, 90  $\mu$ M KCl and 4.4  $\mu$ M nigericin. Both calibration curves were calculated under polynomial fitting (order 4) from measured data ratios. B, Real time cell reaction (25  $\mu$ m from the hyphal tip) of *G. margarita* loaded with BCECF to nigericin/ $K^+$  addition after 300 s ( $\uparrow$ ) at external pH 5. The fluorescence ratios (right y-axis) for 490 nm/450 nm excitations and total fluorescence (left y-axis) at 450 nm excitation are given. Horizontal arrows ( $\Leftarrow$ ,  $\Rightarrow$ ) indicate the corresponding axis of the two curves.

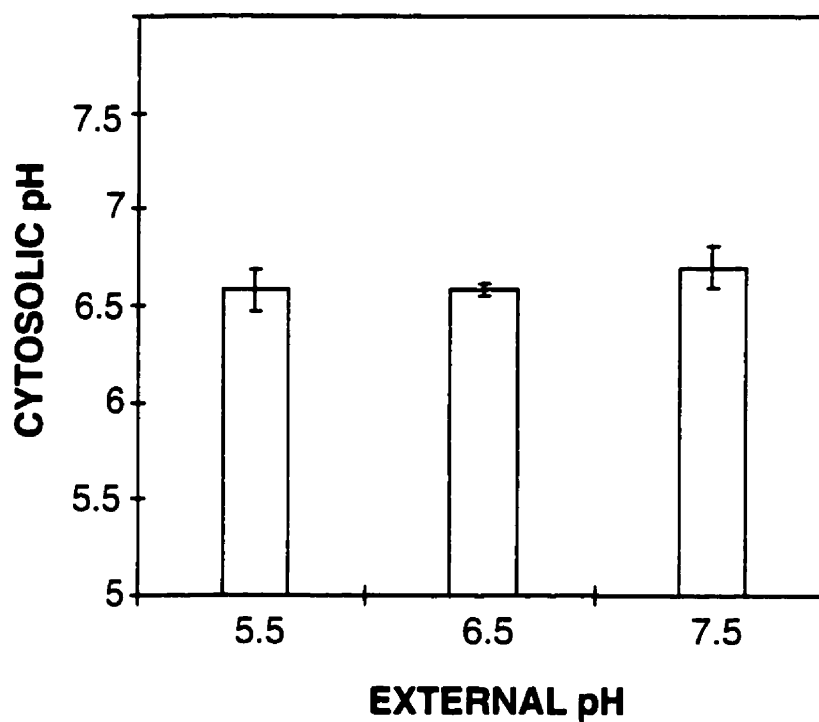
To ensure that the acidity measured at the tip was not an underestimation due to a local insufficient BCECF concentration, kinetics of BCECF loading have been followed at the tip and 9.5  $\mu\text{m}$  behind for *G. margarita* and *G. intraradices* (Figure 3.6). The kinetics show that pH values stabilize before loading of BCECF is completed. Forty-five minutes of staining for *G. margarita* and fewer for *G. intraradices* (perhaps because hyphae have smaller diameter) are necessary for accurate pH measurements. This is true both at the tip and behind. Thus, the staining procedure was standardized to 45 min hyphal load prior to observation. Once the dye reached the critical concentration, local cytoplasmic movement like this of the above-mentioned apical organelles, although interfering with both the 450 and 490 nm signal intensities did not interfere with the ratio measurements.

#### 3.6.2.3 Effect of Extracellular pH

Normal pH of M medium is 5.5 before autoclaving and slightly higher after. Experiments with higher pH, buffered at 6.5 and 7.5, did not affect cytosolic pH (Figure 3.7). There was no difference observed whether the fungus had grown in the tested medium for several days or whether the pH of the medium was modified 4 hours before intracellular pH measurements (not shown). More acidic media (pH 4 and 4.5) could not be tested because they caused formation of successive (2 to 5 in 7 days) short (20-65  $\mu\text{m}$ ) germ tubes that were not healthy enough to fluoresce.



**Figure 3.6** Loading kinetics of *Gigaspora margarita* (A) and *Glomus intraradices* (B) germ tubes with BCECF-AM at the tip (2  $\mu\text{m}$ ) and 9.5  $\mu\text{m}$  behind: cytosolic pH (▲), total fluorescence at 450 nm excitation (□). *G. intraradices* cytosolic pH values are estimations using the calibration relationship established with *G. margarita*.



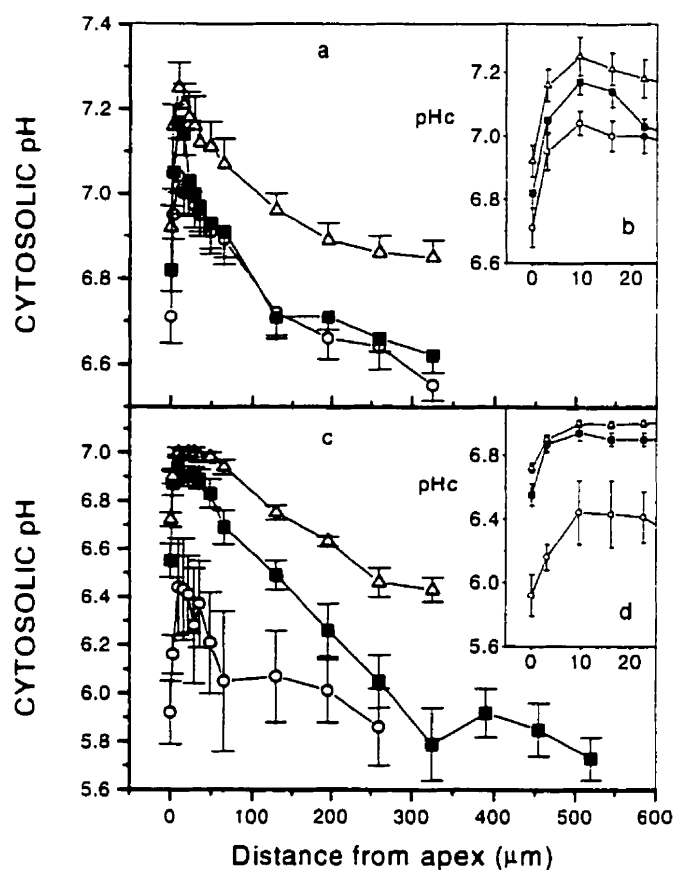
**Figure 3.7** Effect of external pH on cytosolic pH of *Gigaspora margarita* germ tube (tip), measured 4 days after spore germination (n=10). The external pH were adjusted (5 mM sodium phosphate buffer) prior to spore inoculation. Error bars are 95% confidence intervals (SE).

#### 3.6.2.4 AM Fungi Cytosolic pH and Different Physiological States

The growth of *G. margarita* germ tube was clearly stimulated when cultured in the presence of a root. A significant increase in the number of lateral hyphae was observed as well as specific "arbuscule like" structures which are not normally seen in the absence of a root. Under the microscope, apices of growth-stimulated germ tube looked similar to unstimulated one, in cell organization and diameter ( $\sim 6.5 \mu\text{m}$ ). However, they showed a significant increase ( $>95 \%$ , Student) of more than 0.2 pH unit (Figure 3.8A) of their whole cytosolic pH profile. Cytosolic pH increased from  $6.7 \pm 0.2$  (0-2  $\mu\text{m}$ ),  $7.0 \pm 0.1$  (9.5  $\mu\text{m}$ ) and  $6.6 \pm 0.1$  ( $> 250 \mu\text{m}$ ) to  $6.9 \pm 0.2$ ,  $7.3 \pm 0.2$  and  $6.9 \pm 0.1$ , respectively. Results with young germ tubes, defined as shorter than a spore diameter, showed intermediate pH values in the first 25  $\mu\text{m}$  region but exhibited farther away a pH similar to the unstimulated longer hyphae. Morphologically, juvenile germ tubes showed larger tube diameter ( $\sim 8.5 \mu\text{m}$ ).

Germ tubes of *G. intraradices* had a small diameter of  $\sim 3 \mu\text{m}$ . However, growing hyphae from a mycorrhizal root presented larger diameters ( $\sim 6 \mu\text{m}$ ) for both culture systems on the solid M medium and on the paper support. Germ tubes of this fungus  $5.9 \pm 0.3$  farther away (Figure 3.8B). Extraradical hyphae had a significant higher ( $>95 \%$ , Student) apical cytosolic pH with a pH of  $6.6 \pm 0.2$  at the tip and  $6.9 \pm 0.2$  behind the tip (9.5  $\mu\text{m}$ ).





**Figure 3.8** Cytosolic pH (pH<sub>c</sub>) profile in hyphae of *Gigaspora margarita* and *Glomus intraradices* vs. different culture conditions. A, For *G. margarita*: in juvenile germ tubes defined as hyphae shorter than one spore diameter (n=8) (■) and in several cm long germ tubes growing in the absence (n=9) (○) or in the presence (Δ) of a *Daucus carota* hairy root (n=12). B, A magnification of the same curves for the first 20 μm. C, For *G. intraradices*: in germ tubes (n=3) (○) and in extraradical hyphal growing from a mycorrhizal *D. carota* hairy root laid directly on the solid medium (n=10) (■) or laid first on a filter paper (n=7) (Δ). D, A magnification of the same curves for the first had a pH of  $5.9 \pm 0.2$  at the tip (0-2 μm),  $6.4 \pm 0.4$  behind the tip (9.5 μm) and a plateau of 20 μm. *G. intraradices* cytosolic pH values are estimations using the calibration relationship established with *G. margarita*. Error bars are 95% confidence intervals (SE).

Nevertheless, the ultimate pH plateau  $5.9 \pm 0.4$  was similar to this of germ tubes. When the mycorrhizal root was separated from the culture medium by a paper filter, hyphae passing through the paper fibers and growing in the solid medium showed a significant increase ( $>95\%$ , Student) in their distal pH plateau up to  $6.4 \pm 0.2$ . Reported pH values for *G. intraradices* are only indicative and cannot be strictly compared to *G. margarita* values since in vivo pH calibration was done with *G. margarita* hyphae. However, comparisons between *G. intraradices* pH values are legitimate.

## 3.7 DISCUSSION

### 3.7.1 Assessment of the Method

The intracellular pH measurements reported in this study were made in coenocytic hyphae characterized by a non-septate hyphal continuum with a highly dynamic cytoplasmic streaming. They were obtained at the photomultiplier with extremely small reading windows ( $6 \mu\text{m}^2$  for *G. intraradices* to  $17 \mu\text{m}^2$  for *G. margarita*) which could explain the relatively large standard errors of the mean (Figure 3.8). These large standard errors could also be a consequence of dynamic local fluctuations as revealed by image analysis (Figure 3.1C). However, careful controls were made in this study to assess that the method of intracellular pH measurements was reliable. The kinetics of

BCECF loading (combined with esterase activities) was measured to insure that pH values were not underestimated (especially at the tip) by insufficient dye concentration (Figure 3.6). It was verified that measurements were not biased by optical artefacts such as excessive background. Finally, if external pH had not been the same throughout the tested cultures, they were not responsible for the observed variations of pH profile since they were shown experimentally not to affect fungal pH (Figure 3.7). The same was observed for plant cells within 4.5 to 7.5 pH range (Gout et al., 1992). To our knowledge, this work clearly shows for the first time the importance of performing kinetic studies of cell loading with BCECF prior to establish a reliable procedure for photometric or image analyses of intracellular pH.

All living hyphae appeared not to show observable distinct darker or brighter zones (Figure 3.1A, B). The fluorescence looked variable but diffuse with no apparent sequestration. Rapid and selective vacuolization of BCECF has been observed for root-hair cells of maize (Brauer et al., 1994), and Rees et al. (1994) reported similar observations for a wide spectrum of fungal phyla using CF (6-carboxyfluorescein) dye. With the coccolithophore *Emiliania huxleyi*, Dixon et al. (1989) observed a uniform BCECF fluorescence throughout the cell and were able to discern two distinct pH zones. Our results suggest that the BCECF-AM dye was preferentially hydrolyzed within the cytosol of the studied AM fungi. Loading behavior measured by fluorescence at 450 nm excitation showed a continuous regular increase in dye hydrolysis (Figure 3.6). The significance of this signal kinetics is multiple, as it is the

sum of the dye diffusion (within the medium and through the fungal plasma membrane) and of the esterase activities. However, pH readings followed a first order behavior before stabilization to their actual values suggesting that only one major hydrolysis mechanism was involved, i.e. occurring in a unique cell compartment. Moreover, the fungal cell behavior to nigericin addition at acidic external pH showed a sudden internal pH control (raise). It is known that  $H^+$ -ATPase activities are stimulated by acidic pH. The vacuoles can also help controlling cell pH by sequestration of invading protons (Kurkdjian and Guern, 1989; Gout et al., 1992) and obviously if the dye would have been located there, vacuolar pH would have shown a drop instead of a raise. Furthermore, the fluorescence at 450 nm excitation proved not to be directly proportional to the hyphal volume (data not shown) indicating that possible non-loaded volumes were filled by organelles such as vacuoles. Taken together, these observations suggest that the pH values measured were those of the cytosol.

### 3.7.2 Characteristic pH Profile

Cytosolic pH values were clearly variable as observed radially in the hypha of *G. margarita*, possibly reflecting local heterogeneity of the cytoplasm (Figure 3.1C). Longitudinal pH along hyphae of *G. margarita*, as given by image analysis (Fig. 1D) and by photometric analysis (Fig. 3B) showed a very reproducible and characteristic profile. This typical pH profile was also observed in *G. intraradices* hyphae (Fig. 8D).

The apical acidic gradient suggests that the physiological activity of AM fungi is concentrated at the hyphal tip, as has already been proposed for cells following apical growth (Turian et al., 1985; Jackson and Heath, 1993; Wessels, 1993; Harold, 1994). The steep pH distribution observed at the hyphal tip could correspond to the steep gradient also observed in various cell activities. For example, the specific apical distribution of the cytoskeleton and vesicles, the calcium gradient and the cell wall dynamic are all related to apical growth and hyphal morphology (Gooday, 1993; Jackson and Heath, 1993; Wessels, 1993; Bartnicki-Garcia et al., 1995; Kaminskyj and Heath, 1996). The cytosolic apical acidity has also been observed in *Neurospora crassa*, *Achlya bisexualis*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Penicillium cyclopium* and in other non fungal elongating cells (Turian et al., 1985; Roncal et al., 1993; Harold, 1994). It is thought to be maintained by the activity of plasmalemma  $H^+$ -ATPases occurring behind the tip. The proton gradient imposed by this uneven distribution of the proton pumps allows influx of  $H^+$ , potentially coupled with co-transport of other ions or nutrients, to occur preferentially at the hyphal tip. Berbara et al. (1995) working on mycorrhizal interactions showed an inward current at the tip of *G. margarita* young germ tubes. Since electrical currents are thought to be carried mainly by protons, our results are in agreement with these electrophysiological studies. In contrast with our finding and with the references cited above, Robson et al. (1996) reported the existence of an alkaline gradient in growing hyphae of *Neurospora crassa*. They argued that previous work did not use BCECF, a nontoxic, ratiometric

dye, and for this reason could have shown artefactitious results. Although we used BCECF, our results are in contrast with those of Robson et al. (1996). One hypothesis could be that *N. crassa* hyphae which exhibited very high extension rates actually possessed an acidic gradient but so steep that it was undetectable.

Our observations that external acidic pH of 4 to 4.5 caused multiple and successive formation of germ tubes with limited growth could be in agreement with the assumption of an ATPase proton pump regulatory mechanism (Harold, 1994; Berbara et al., 1995). Under these acidic conditions, the germ tube metabolism may have been energetically insufficient for supporting the alkalization action of the  $H^+$ -ATPase pumps (Gout et al., 1992).

### **3.7.3 Cytosolic pH is Physiological State Dependent**

The response of *G. margarita* germinating spores to the presence of transformed carrot roots (or root exudates) expressed in term of growth stimulation has already been documented (Bécard and Piché, 1989a,b). In the present study, the fungal response was observed at the cellular level using intracellular pH as an indicator. Hyphal growth stimulation and the intracellular pH increase are likely to be correlative events, both expressing the presence of root factors involved in some symbiotic process. It remains to be shown how quickly the pH response occurs after the perception of these root factors. Is the pH response a late consequence of the growth stimulation or a prerequisite cellular state before stimulation can occur? The

advantage of measuring intracellular pH instead of growth, if the former criterion is an early response, is obvious. It can be utilized for more rapid screening experiments of the root factors and more importantly, to discover important factors that would not be sufficient by themselves to cause a growth response.

The results obtained with *G. intraradices* are complementary to the *G. margarita* results. With this fungus also, hyphal tips in the presence of a root have a higher pH profile. However, this time, they correspond to extraradical extension of intraradical structures, and have a symbiotic mode of growth. The use of a filter paper which prevented direct root contact with the medium led to a raise of only the nonapical pH value of extraradical growing hyphae. The roots were clearly not in the same physiological state for the two culture systems neither were the fungal hyphae. With the use of a paper support, roots could be in water and/or nutrient stress offering minimal surface contact with the nutrient medium. Entrapment of root compounds within the paper fibers (uninvestigated) could also have occurred. These results have to be put in relation with works of St-Arnaud et al. (1996). They observed that growth of extraradical hyphae could be stimulated when hyphae are artificially separated from some hypothetical inhibitory compounds released by the roots.

In a speculative attempt to integrate data obtained with both fungi, our observations can be summarized as follows:

a) the apical region of hyphae presents a typical pH profile: more acidic at the tip, sharply raising up and gradually dropping down further away from the tip; b) young germ tubes (shorter than 200  $\mu\text{m}$ , *G. margarita* average spore diameter) exhibited a pH profile which dropped at the tip; c) the whole pH profile of the germ tube is significantly raised when approaching a compatible host root; d) extraradical hyphal growth is also associated with a higher pH profile in the apical region of the hyphae; e) the pH profile is even higher in extraradical hyphae growing with mycorrhizal roots under a water (or a nutrient) stress.

More work is required to know whether fine cellular mechanisms such as  $\text{H}^+$  mediated signal transduction or membrane transport activation were involved in these various fungal responses. Our results show that intracellular pH is an interesting candidate as a physiological marker of the fungal symbiotic state. The experimental setup using photometric or image analysis proved to be suitable to study live communication between the organisms in a plant-fungus interaction. It will be used for further investigations and attempts to answer the above questions.



### 3.8 ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Drs. C. Chavarie and J. Archambault as project initiators, to Dr. M. Buschmann for reviewing this document and to M. Buée and R.D. Williams for their technical help.

### 3.9 LITERATURE CITED

**Agutter PS, Malone PC, Wheatley DN** (1995) Intracellular transport mechanisms: a critique of diffusion theory. *J Theor Biol* **176**: 261-272

**Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD** (1994) Cell signaling, *In* Molecular biology of the cell. Third edition. Garland Publishing, New York, US, pp 721-787

**Bartnicki-Garcia S, Bartnicki DD, Gierz G, Lopez-Franco R, Bracker CE** (1995) Evidence that spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp Mycol* **19**: 153-159

**Bécard G, Fortin JA** (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol* **108**: 211-218

**Bécard G, Piché Y** (1989a) New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol* **112**: 77-83

**Bécard G, Piché Y** (1989b) Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2320-2325

**Beever RE, Burns DJW** (1980) Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. In HW Woolhouse, ed, *Advances in Botanical Research*. Vol 8. Academic Press. New York, US, pp. 127-219

**Berbara RLL, Morris BM, Fonseca HMA, Reid B, Gow NAR, Daft MJ** (1995) Electrical currents associated with arbuscular mycorrhizal interactions. *New Phytol* **129**: 433-438

**Bonfante P, Perotto S** (1995) Tansley Review No. 82: Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol* **130**: 3-21

**Brandao RL, Castro IM, Passos JB, Nicoli JR, Thevelein JM** (1992) Glucose-induced activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Fusarium oxysporum*. *J General Microbiol* **138**: 1579-1586

**Brauer D, Otto J, Tu SI** (1994) Selective accumulation of the fluorescent pH indicator, BCECF-AM, in vacuoles of maize root-hair cells. *J Plant Physiol* **145**: 257-261

**Chabot S, Bécard G, Piché Y** (1992) Life cycle of *Glomus intraradix* in root-organ culture. *Mycologia* **84**: 315-321

**Dixon GK, Brownlee C, Merrett MJ** (1989) Measurement of internal pH in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* using 2',7'-bis-(-2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethylester and digital imaging microscopy. *Planta* **178**: 443-449

**Doner LW, Bécard G** (1991) Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotech Techniques* **5**: 25-28

**Elias KS, Safir GR** (1987) Hyphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exudates. *Appl Environ Microbiol* **53**: 1928-1933

**Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S** (1989) In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* **7**: 243-255

**Giovannetti M, Avio L, Sbrana C** (1993a) Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. *New Phytol* **123**: 114-122

**Giovannetti M, Sbrana C, Avio L** (1993b) Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytol* **125**: 587-593

**Gout E, Bligny R, Douce R** (1992) Regulation of intracellular pH values in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. *J Biol Chem* **15**: 267-287

**Gooday GW** (1993) The dynamics of hyphal growth. *Mycol Res* **99**: 385-394

**Harold FM** (1994) Ionic and electrical dimensions of hyphal growth, *In* Wessels/Meinhardt, ed, *The Mycota I: Growth, Differentiation and Sexuality*, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 89-109

**Imai T, Ohno T** (1995) The Relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3604-3608

**Isfort RJ, Cody DB, Asquith TN, Ridder GM, Stuard SB, Leboeuf RA** (1993) Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation - Implications for the role of hydrogen ions in signal transduction. *Eur J Biochem* **213**: 349-357

**Jackson SL, Heath IB** (1993) Roles of calcium ions in hyphal tip growth. *Microbiol Rev* **57**: 367-382

**Kaminskyj SGW, Heath IB** (1996) Studies on *Saprolegnia ferax* suggest the general importance of the cytoplasm in determining hyphal morphology. *Mycologia* **88**: 20-37

**Koide RT, Schreiner RP** (1992) Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 557-581

- Kurkdjian A, Guern J** (1989) Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 271-303
- Mosse B, Hepper C** (1975) Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. *Physiological Plant Pathology* **5**: 215-223
- Nair MG, Safir GR, Siqueira JO** (1991) Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. *Appl Environ Microbiol* **57**: 434-439
- Novak S, D'Amore T, Stewart GG** (1990) 2-Deoxy-D-glucose resistant yeast with altered sugar transport activity. *FEBS Letters* **269**: 202-204
- Powell CL** (1976) Development of mycorrhizal infections from endogone spores and infected root segments. *Trans Br Mycol Soc* **66**: 439-445
- Pressman BC** (1976) Biological applications of ionophores. *Annu Rev Biochem* **45**: 501-530
- Rees B, Shepherd VA, Ashford AE** (1994) Presence of a motile tubular system in different phyla of fungi. *Mycol Res* **98**: 985-992
- Robson GD, Prebble E, Rickers A, Hosking S, Denning DW, Trinci APJ, Robertson W** (1996) Polarized growth of fungal hyphae is defined by an alkaline pH gradient. *Fungal Gen Biol* **20**: 289-298

**Roncal T, Ugalde UO, Irastorza A** (1993) Calcium-induced conidiation in *Penicillium cyclopium*: Calcium triggers cytosolic alkalization at the hyphal tip. *J Bacteriology* **175**: 879-886

**Simon L, Bousquet J, Levesque RC, Lalonde M** (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69

**Smith SE, Gianinazzi-Pearson V** (1988) Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**: 221-244

**St-Arnaud M, Hamel C, Fortin JA** (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycol Res* **100**: 332-338

**Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H** (1995) Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* **87**: 560-573

**Tsien RY** (1989) Fluorescent indicators of ion concentrations. *Meth Cell Biol* **30**: 127-156

**Turian G, Ton-That TC, Perez RO** (1985) Acid tip linear growth in fungi: requirements for  $H^+/Ca^{2+}$  inverse gradients and cytoskeleton integrity. *Botanica Helvetica* **95**: 311-322

**Yoshida S** (1994) Low Temperature-Induced Cytoplasmic Acidosis in Cultured Mung Bean (*Vigna radiata* (L. Wilczek)) Cells. *Plant Physiol* **104**: 1131-1138

**Watrud LS, Heithaus III JJ, Jaworski EG** (1978) Geotropism in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycologia* **70**: 449-452

**Wessels JGH** (1993) Tansley Review No. 45: Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytol* **123**: 397-413

## CHAPITRE IV

### REGULATION OF MYCORRHIZAL SYMBIOSIS: DEVELOPMENT OF A NUTRITIONAL MODEL

Ce chapitre présente les travaux ayant porté sur le développement d'un modèle biocinétique structuré décrivant la culture dualiste du champignon endomycorhizien à arbuscules et à vésicules *Glomus intraradices* sur des racines de carotte (*Daucus carota*) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. L'évolution de la croissance du champignon en terme de spores et de la croissance des racines en terme de masse sèche ont été étudiées en relation de l'évolution de la composition du milieu de culture ainsi que de la composition intracellulaire (estimée). L'étude a été centrée sur l'importance de l'ion phosphate et de la concentration intraracinaire en glucides sur le développement du champignon. Des cultures en milieu minimal (M) liquide en boîte de Pétri ont été réalisées avec des racines non-mycorhizées et mycorhizées pour une plage étendue de concentrations en ion phosphate inorganique: 0,02; 0,04 (milieu M); 0,12 et 1,00 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Pi). Les glucides (saccharose, glucose et fructose) ainsi que les principaux ions consommés ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{K}^+$ ) du milieu de culture ont été suivis durant les cultures. Les autres ions mesurés ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) n'ont pas été significativement consommés. L'ion phosphate a été l'élément limitant de la croissance des racines pour les concentrations initiales de 0,02 and 0,04 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$



et le nitrate a été limitant pour les cultures démarrées à 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . La disparition du glucose du milieu de culture a aussi coïncidé avec l'arrêt de croissance des racines mycorrhizées et non-mycorrhizées alors que le fructose n'a été que partiellement consommé. Le taux spécifique de croissance des racines non-mycorrhizées a été significativement réduit pour des concentrations initiales en  $\text{Pi}$  inférieures à 0,12 mM  $\text{Pi}$  de  $0,068 \pm 0,012 \text{ d}^{-1}$  ( $\geq 0,12 \text{ mM}$ ) à  $0,041 \pm 0,006 \text{ d}^{-1}$  (0,04 mM) et  $0,022 \pm 0,009 \text{ d}^{-1}$  (0,02 mM). Les valeurs pour des racines mycorrhizées ont été encore plus faibles avec  $0,0049 \pm 0,0020 \text{ d}^{-1}$  et  $0,021 \pm 0,008 \text{ d}^{-1}$  respectivement pour 0,02 et 0,04 mM  $\text{Pi}$ . Le taux spécifique de production de spores du champignon *G. intraradices* a été maximal à  $0,042 \text{ d}^{-1}$  pour les cultures à 0,12 mM  $\text{Pi}$ .

Le modèle biocinétique dualiste développé a été basé sur les concentrations extra et intracellulaires en  $\text{Pi}$  et en glucides et extracellulaires en nitrate ainsi que sur la translocation du  $\text{Pi}$  du champignon à la racine-hôte et sur la consommation des glucides intraracinaires par le champignon. La validation du modèle a permis de confirmer le rôle en tant que clef décisionnelle du  $\text{Pi}$  intraracinaire face à la production de spores. De plus, une compétition significative du champignon pour les glucides intraracinaires a été mise en évidence.

Cet article a été soumis à la revue *Plant Physiology*.

## MANUSCRIT #3

### REGULATION OF MYCORRHIZAL SYMBIOSIS: DEVELOPMENT OF A NUTRITIONAL MODEL

JOLICOEUR, Mario <sup>\* 1</sup>, Édith BOUCHARD-MARCHAND <sup>1</sup>, Guillaume  
BÉCARD<sup>2</sup>, Michel PERRIER <sup>1</sup>

*1. BIOPRO Research Center, École Polytechnique de Montréal, Chemical Engineering Dept., 2900 Édouard-Montpetit, Montréal, Québec, Canada, C.P. 6079, Succ. Centre-Ville, H3C 3A7.*

*2.Laboratoire de Mycologie Végétale, Université Paul-Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.*

*\* Corresponding Author*

#### 4.1 FINANCIAL SUPPORT

The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Premier Tech Ltd. funded this research project.

## 4.2 ABSTRACT

Nutrition of *Daucus carota* hairy roots, non-mycorrhized and mycorrhized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*, was studied in Petri dish liquid cultures with the objective to assess structured modelling concepts of the symbionts growth behaviour. The minimal (M) medium was used varying its initial phosphate (Pi) concentration at 0.02, 0.04, 0.12 and 1.00 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Sugars and macronutrients uptake was monitored during cultures. Phosphate ion was the limiting nutrient for 0.02 and 0.04 mM Pi. Glucose was preferentially consumed over fructose and glucose depletion (within experimental error) of the culture media coincided with mycorrhizal and non-mycorrhizal roots growth cessation. The specific growth rate (dry mass) of non-mycorrhizal roots was significantly reduced under low Pi from  $0.068 \pm 0.012 \text{ d}^{-1}$  ( $\geq 0.12 \text{ mM}$ ) to  $0.041 \pm 0.006 \text{ d}^{-1}$  (0.04 mM) and  $0.022 \pm 0.009 \text{ d}^{-1}$  (0.02 mM). Values for mycorrhizal roots were even lower. *G. intraradices* specific spore production rate was maximum at  $0.042 \text{ d}^{-1}$  for 0.12 mM Pi. A growth behaviour dual model for roots dry mass and fungus spore number based on extra and intracellular concentrations of Pi, sugar and extracellular nitrate as well as Pi translocation between symbionts and roots sugar uptake by the fungus is presented. The model validation confirmed intracellular Pi storages in roots as a decision switch for *G. intraradices* spore production. A significant AM fungus competition for root soluble sugars was also revealed.

### 4.3 INTRODUCTION

All along a plant life cycle from seed germination to new seed production, a precise nutrient requirement needs to be fulfilled. This fact seems obvious but natural soils generally offer low concentrations of key nutrients such as phosphate for which the free concentration in fertile soils is less than 1  $\mu\text{M}$  (Schachtman et al., 1998; Clarkson, 1985). Phosphate is one of the most important substrates for living cell metabolism and its deprivation can result in a decrease of plant cells growth rate (Thorsteinsson and Tillberg, 1987) through a significant decrease in ATP (-74%) and ADP (-91%) content (Duff et al., 1989). Plants have thus developed specific morphologic and metabolic adaptations to be able to grow on limiting soil conditions (Theodorou and Plaxton, 1993).

Plants capable of growing under low nutrient conditions have been shown to utilise nutrients more efficiently. They express a lower efflux rate of key nutrients such as phosphate (Bieleski, 1973; Clarkson and Hanson, 1980; Clarkson, 1985) and a higher influx capacity through an increase of their high affinity uptake system capacity ( $V_{\text{maxI}}$ ) (Clarkson et al., 1978; Lee et al., 1990; Gilbert et al., 1997; Liu et al., 1998, and references therein). Plant roots can also exude strong chelators such as oxalate (Delucia et al., 1997), citrate and malate (Gilbert et al., 1997) and other acids that

favour phosphate release in the rhizosphere from poorly soluble compounds such as  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  and  $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$ . Some plants make longer root hairs to increase their uptake area (Bielecki, 1973; Schachtman et al., 1998). Finally, land plants have evolved to live in symbiotic association with microorganisms such as *Rhizobium* bacteria and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. These microorganisms are key partners to improve nutritional status of their hosts.

Among soil compounds and environmental factors, inorganic phosphate has a major influence on mycorrhization processes. Low concentrations of inorganic phosphate (Pi) have been shown to favour the mycorrhization establishment (Bécard and Fortin, 1988; Waterer and Coltman, 1988; Schachtman et al., 1998) and high Pi concentrations to be inhibitor of mycorrhization establishment (Mosse and Phillips, 1971). The reasons why phosphate nutrition seems to play a regulatory role in the mycorrhizal symbiosis are not clear (Schachtman et al., 1998, and references therein). One possible explanation could be that the quality of root exudates from plant experiencing P deprivation influences some plant-fungus signalling (Elias and Safir, 1987; Nagahashi and Douds, 1996). A characteristic of phosphate nutrition is its accumulation within living tissues. In plants, the sap-to-soil phosphate ratio can be as high as 400 (Bielecki and Fergusson, 1983). Phosphate is principally accumulated in the form of Pi in the vacuole of plant cells (Bielecki and Fergusson, 1983) and in the form of poly-phosphate in the cytoplasm of AM fungi (Beever and Burns, 1980; Capaccio and Callow, 1982). The host plant thus benefits of the AM fungus and of its

high uptake affinity for phosphate (Bielecki, 1973; Cress et al., 1979; Thomson et al., 1990; Harrison and van Buuren, 1995).

Other important parameters in symbiosis dynamic are the external nitrogen source and roots intracellular sugars. As for Pi, AM fungi are known to uptake nitrate, ammonia and translocate these to their host root (Ames et al., 1983; Pfeffer et al., 1998). Cereals colonization by various AM fungi has shown to be influenced by the nitrogen source ratio  $\text{NO}_3:\text{NH}_4$  as well as fungi species (Thompson, 1986). Schellenbaum et al. (1998) have observed that mycorrhizal (*Glomus mosseae*) maize plants did not accumulate sugars as compared to non-mycorrhizal. Under nutrient stress such as Pi, plants have been shown to increase their carbohydrate contents (McGrath et al., 1998; Wang and Tillberg, 1998) and to be more receptive to mycorrhization.

Once the symbiosis is established, the fungal cell is simultaneously and continuously in contact with plant nutrient pools at the arbuscule end and with the environment nutrient content at the extraradical hyphal end. One can think that the qualitative and quantitative differentials between these two nutrient pools that the fungus is sensing influence further development of the symbiotic relationship.

In this context, the first objective of this study was to describe the symbiosis behaviour by establishing a biokinetic growth model including the respective nutritional status of the fungus (*Glomus intraradices*) and its host (*Daucus carota* hairy roots). The second objective was to evaluate the role of Pi and roots soluble

sugars as key regulatory nutrients for the symbiosis. Liquid cultures were done in Petri dish for a wide range of medium inorganic phosphate (Pi) concentration (0.02 to 1 mM Pi) using non-mycorrhizal and mycorrhizal roots in order to acquire growth and nutritional data. Biokinetics data were then calculated and used for the dual growth model build-up and validation. The originality of this study is to describe the mycorrhizal symbiosis in a model relating root growth and spore production of an AM fungus with key nutrient pools, dynamics and exchanges between symbionts.

## 4.4 MATERIALS AND METHODS

### 4.4.1 Biological Material

Hairy root cultures of *Daucus carota* (Bécard and Fortin, 1988) were maintained by transferring monthly ~0.6 g of root (FW) in 80 mL of modified White's medium (Bécard and Fortin, 1988) into 250 mL Erlenmeyer flasks. The flasks were agitated at 120 rpm and maintained at  $23\pm1^{\circ}\text{C}$  in continuous light .

Spores of *Glomus intraradices* Schenck & Smith were produced in vitro on carrot (*Daucus carota*) hairy roots (Bécard and Fortin, 1988). Mycorrhizal cultures were originally started with spores isolated from soil as described by Chabot et al. (1992). Subculture of mycorrhizal roots was performed every 2-3 months. Colonized root

pieces were transferred to fresh solid M medium (Bécard and Fortin, 1988) on one side of two compartment plastic Petri dishes (9 cm in diameter) filled with 20 mL solidified (0.4% Phytigel, Sigma) M medium in both dish compartments (Fortin et al., 1996; St-Arnaud et al., 1996). Petri dishes were incubated in the dark at  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . After one month the fungus jump in the root free compartment and grow intensively. Most spores are produced in the root free compartment.

#### 4.4.2 Experimental liquid Cultures

Mycorrhizal *D. carota* hairy roots used as inocula to start the experimental liquid cultures were prepared in plastic Petri dishes (9 cm in diameter) as follows: 0.5 g (FW) of non-mycorrhizal hairy roots obtained from 1 month old flask and a 1 x 1 x 0.5 cm (LxWxH) gel plug containing spores and hyphae produced in dual compartment cultures (see above) were placed in a plastic Petri dish (9 cm in diameter) filled with 20 mL liquid M medium (Bécard and Fortin, 1988) containing 0.12 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . The roots and the fungus were grown for 3 months in the dark at  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$  to produce mycorrhizal roots. Their mycorrhizal status was checked by examining the dishes visually for the presence of extraradical spores and hyphae. An abundant production of extraradical fungus reflects a successful mycorrhizal establishment. Mycorrhizal roots were harvested aseptically without the inoculum gel piece, cut into ~1 cm pieces with a scalpel and transferred ( $0.20 \pm 0.12$  g WW) along with  $700 \pm 200$  spores into plastic Petri dishes (9 cm in diameter) to start the experimental liquid cultures.



The experimental liquid cultures of non-mycorrhizal *D. carota* hairy roots were started using non-mycorrhizal *D. carota* hairy roots obtained from 1 month old flask. Preliminary experiments were done following the mycorrhizal hairy root inoculum preparation procedure (without the addition of the fungus as described above). Non-mycorrhizal root cultures in M liquid medium started from Petri dish intermediate cultures and directly from shake flask cultures behave the same as specific growth rate and final roots wet and dry weights were similar for both procedures. Non-mycorrhizal hairy roots inocula of  $0.20 \pm 0.12$  g WW were used per plastic Petri dish. (9 cm in diameter).

Petri dish liquid cultures were filled with 20 mL M-based medium per dish with initial phosphate concentrations of 0.02 mM, 0.04 mM, 0.12 mM and 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . The 0.02 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  medium was prepared in diluted (1/3) M medium to facilitate phosphate ion detection by ion chromatography analysis. The 0.04 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  medium was prepared with both diluted (M/3) and standard M media without observing any hairy roots growth behaviour nor spore production differences. The data presented in this paper represent the average of both M/3 and standard M media cultures data. All media were sterilised in an autoclave for 30 min at  $121^\circ\text{C}$  (1 atm). Petri dishes were incubated in the dark at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 4.4.3 Analytical

#### 4.4.3.1 *Sampling and Harvesting*

All media of Petri dish cultures were sampled at harvest for further analyses. Liquid samples from media with initial phosphate concentrations of 0.04 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and above were filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) and stored at  $-20^\circ\text{C}$  before analysis. The 0.02 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 0.04 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  liquid samples were evaporated to 1:10<sup>th</sup> of their initial volume ( $60^\circ\text{C}$ ) to maximise phosphate detection by ion chromatography. Roots were not sampled during cultures but harvested at the end of the cultures. They were fresh weighed, dry weighed (24 h at  $80^\circ\text{C}$ ) and their level of mycorrhizal colonization was measured. The volume of the residual liquid medium was measured

#### 4.4.3.2 *Production of AM Fungi Propagule*

Propagule production was evaluated as spore number per dish and vesicle density per root length. The number of spores per dish was measured exhaustively by observations under a microscope. Roots were stained using chlorazol-black to being able to observe vesicles (Brundrett et al., 1984). Stained roots were observed under microscope by 2 mm sections, the optical field for a 20x magnification. The percentage of 2 mm segments containing vesicles over the total section number observed was determined as the root vesicle colonization. The average number of vesicles per 2 mm segment containing more than one vesicle was determined as the vesicle density.

#### 4.4.3.3 Extracellular Nutrient Analysis

Carbohydrates of the culture media (sucrose, glucose and fructose) were analysed by an HPLC system consisting of a Waters model 6000A pump, a Gilson model 231/401 automatic injector, a Gilson model 132 refractive index detector, and a Hewlett-Packard model HP3394A integrator. Separation was achieved using a Biorad HPX-87C column maintained at 80°C and water as the mobile phase flowing at a rate of 1.0 mL•min<sup>-1</sup>.

Major ions (Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>) were analysed using a Dionex (Dionex Canada Ltd, Oakville, Canada) HPLC system equipped with a gradient pump, an automated sampler and a pulsed electrochemical detector in the conductivity mode, controlled with the Dionex AI-450 software. Both anions and cations were analysed at 23±1°C. Anions were separated using a 4 x 250 mm IONPAC AS4A-SC column, a guard column (IONPAC AG4A-SC), and an anion self regeneration suppressor (ASRS-1) to improve the signal-to-noise ratio. The mobile phase consisted of an aqueous bicarbonate buffer (1.8 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ 1.7 mM NaHCO<sub>3</sub>) solution flowing at a rate of 2.0 mL•min<sup>-1</sup>. This allowed to separate, within 10 minutes, all major anions present in the M medium samples. Cations were separated using a 4 x 250 mM IONPAC CS-12 analytical column, a guard column (IONPAC CG-12 Guard column), and a cation self regenerating supressor (CSRS-1) to reduce signal-to-noise ratio. The mobile phase was an aqueous methanesulphonic acid (20 mM) solution flowing at a rate of 1.0 mL•min<sup>-1</sup>, which was suitable to separate the cations within 10 minutes.

#### 4.4.3.4 Intracellular Nutrient Analysis

Intracellular nutrient analyses were made in order to determine the root intracellular contents in phosphate and total sugars (as the sum of the sucrose, glucose and fructose contents). Non-mycorrhizal hairy roots shake flask cultures using MW medium (see above) grown in P-sufficient conditions (1 week old) and P-exhausted conditions (3 weeks old) were analysed. Fresh root samples of 1 to 5 g WW were withdrawn, rinsed three times for 1 s in 500 mL Nanopure water (Barnstein, Sybron Corp., Iowa, USA). Roots were then crushed in a mortar and suspended in 10 to 20 mL of Nanopure water. A liquid sample was filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  syringe filter for ionic chromatography analysis. Ions concentration results were transformed in mmol per g DW of root and mmol per L of root cell water content according to an average wet-to-dry ratio of 10 using the following equation :

$$mM = \frac{mmol}{gDW} \cdot 1000 \frac{gH_2O}{L} \cdot \frac{1gDW}{9gH_2O} \quad (4.1)$$

#### 4.4.3.5 Elementary Analysis

Elementary analysis of P-starved root culture conditions, 5 month old Petri dish culture using M medium at 0.02 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , was made in order to evaluate the root mass yield on phosphate  $Y_{r/p}$ . Fresh non-mycorrhizal root samples of 1 g WW were rinsed three times for 1 s in 500 mL Nanopure water. Roots were than dried out at

80°C for 24 h before analysis. The elementary phosphorus analysis was done under the Quickchem #10-115-01-1-C method (Lachat Instruments, Milwaukee, WI, USA) which is based on the Environmental Protection Agency EPA-365.4 method. The elementary carbon analysis was carried out by the measurement of CO<sub>2</sub> generated after the combustion of a 1 to 3 mg DW root sample at 800°C in an oven using a pure oxygen gas flow. A Dohrman DC-190 analyser equipped with a Fuji 3300 infra-red detector and a Dohrman DC-183 combustion unit was used. The elementary nitrogen analysis was done using the Quickchem #10-107-06-2-D method which is based on the #EPA-600/4-79-020 rev. Marsh 83 method.

#### 4.4.3.6 *Glomus intraradices* Extraradical Network Specific Mass

The measurement of the specific mass of *Glomus intraradices* extraradical network was required for the growth model as the fungus growth is described as dry weight. Spore and mycelium network were collected from 4 month old dual-compartment Petri dish cultures (St-Arnaud et al., 1996) as described by Jolicoeur et al. (1998) using 0.01 M citrate buffer at pH 6.0 and 25°C (Doner and Bécard, 1991). The distal side (root free) of ten to 30 dual compartment dishes used for spore production (see above) were harvested. Spores and mycelium network were rinsed on a 0.45 µm (25 mm diameter, cellulose acetate, Millipore) syringe filter with 3 times 100 mL Nanopure water and then suspended in 50 mL Nanopure water. A 1 mL sample was diluted into 19 mL of water in a standard Petri dish (9 cm in diameter) for spore count by observations under a microscope. The total spore number of the 50 mL was than

calculated. The remaining spore and mycelium suspension was filtered out (0.45  $\mu\text{m}$ ) and the fungal material was dried out at 80°C for 24 h. The spore and mycelium dry weight was measured and the spore weight (including suspensor hyphae) determined after correcting for the filter loss of weight through the whole operation steps. The correction of the filter weight was in average of -0.00024 g per filter (representing a loss of 0.93% of the filter actual weight) and was determined using 20 filters as the mass difference through the experiment. Two experiments were carried out using 295 188 and 234 277 spores and their extraradical hyphal network. An average value of  $1.917\text{e}^{-7} \pm 5.255\text{e}^{-10}$  g DW per spore including its suspensor hyphae.

#### *4.4.3.7 Dual Model Simulations*

The model simulations were done using the Matlab software (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA). The differential equations system was integrated through a Runge-Kutta of order 4 subroutine (Dr. A. Fortin of the Department of Applied Mathematics). The model error minimisation was done using the FMINS subroutine of the optimisation toolbox (Matlab) based on the Nelder-Mead simplex algorithm (Nelder and Mead, 1985).

#### *4.4.3.8 Kinetic Parameters Calculation*

Maximum specific root growth rate and maximum specific spore production rate were calculated by linear regression using exponential phase data from hairy roots dry

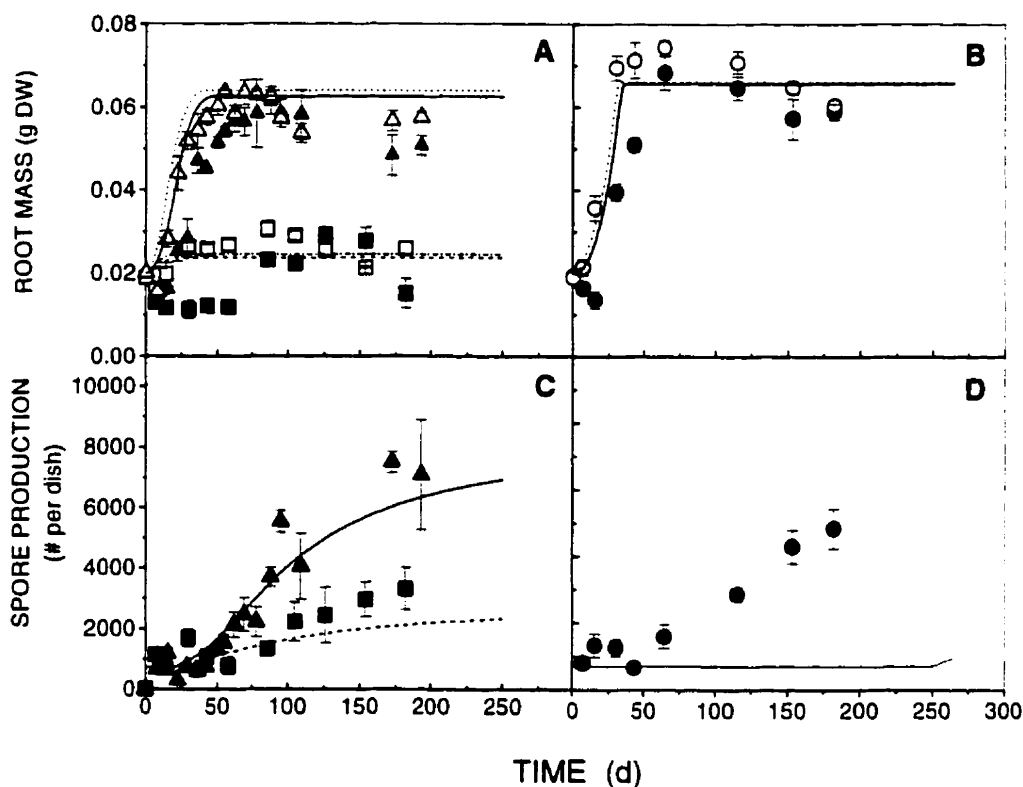
weight and spore number obtained from liquid cultures. Root dry mass yields on nitrate and potassium were determined by linear regression of the dry mass formed per mmol of ion consumed throughout the liquid cultures. The root mass yields on phosphate and total sugars were determined as the total dry mass formed to the total phosphate and sugar consumption.

## **4.5 RESULTS AND DISCUSSION**

The use of hairy roots as host for an AM fungus does not represent natural plant growth conditions but avoids plant shoot side effects in studies on root nutrition. Experiments were carried out in liquid cultures rather than on solid cultures to maintain a continuous contact of both the extraradical mycelium of the fungus and the host root with the culture medium. The growth model establishment and validation was based on results obtained with the liquid cultures.

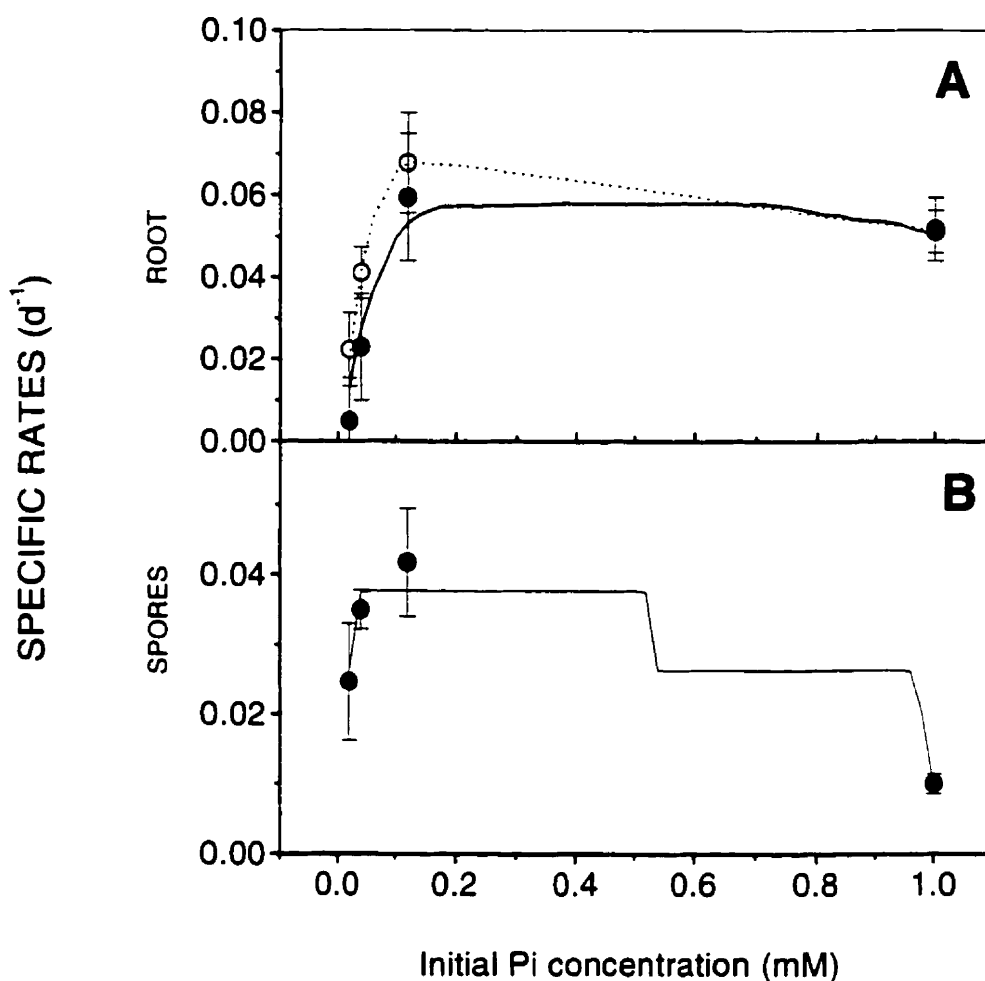
### **4.5.1 Effect of Initial Phosphate Concentration on non-mycorrhizal Root Growth and Nutrition**

Root growth was significantly reduced at initial inorganic phosphate ( $\text{Pi}$ ) concentrations below 0.12 mM (Figures 4.1A and 4.2A). Final root dry mass at 0.02 mM  $\text{Pi}$  was 2.4 fold lower than at 0.12 mM  $\text{Pi}$  (Figure 4.1A) and 2.8 fold lower than at



**Figure 4.1** Non-mycorrhizal and mycorrhizal *D. carota* hairy roots with the AM fungus *Glomus intraradices* grown at different initial  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentrations in liquid cultures in Petri dish. Non-mycorrhizal hairy roots with hollow symbols and mycorrhizal roots with solid symbols. A, Hairy root growth: Initial Pi concentration of 0.02 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :  $\square$ ,  $\blacksquare$ . Initial Pi concentration of 0.12 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :  $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ . Growth model estimations: non-mycorrhizal at 0.02 mM Pi (---), 0.12 mM Pi (.....), mycorrhizal at 0.02 mM Pi (- - -) and at 0.12 mM Pi (\_\_\_\_\_). B, Hairy root growth: Initial Pi concentration of 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Growth model estimations: non-mycorrhizal (.....), mycorrhizal (\_\_\_\_\_). C, *Glomus intraradices* spore production at initial Pi concentration of 0.02 mM Pi ( $\blacksquare$ ) and 0.12 mM Pi ( $\blacktriangle$ ). Growth model estimations: 0.02 mM Pi (- - -) and 0.12 mM Pi (\_\_\_\_\_). D, *Glomus intraradices* spore production at initial Pi concentration of 1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Growth model estimation: (\_\_\_\_\_). (n=5). Error bars are standard deviations.



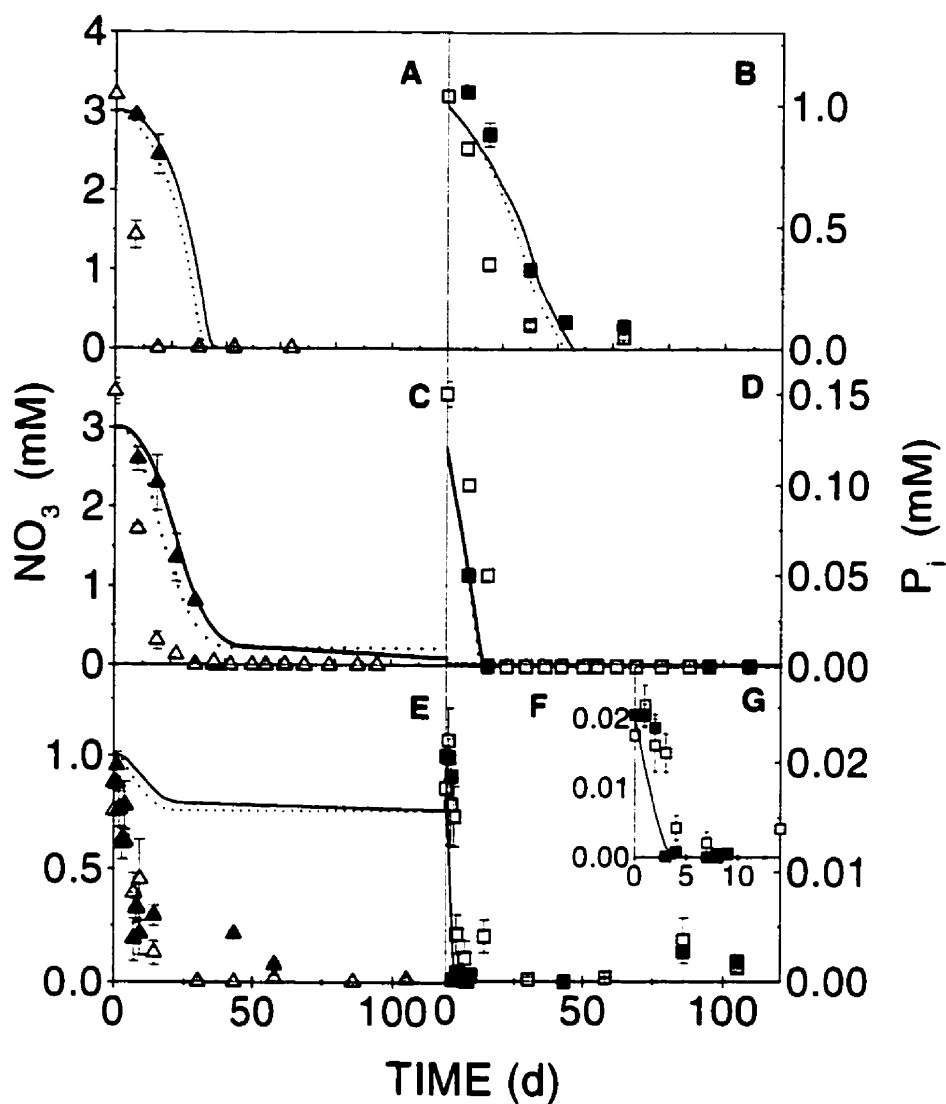


**Figure 4.2** Specific growth rate response of *D. carota* hairy roots and AM fungi *Glomus intraradices* to different initial  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentrations in liquid cultures in Petri dish. Non-mycorrhizal hairy roots with hollow symbols and mycorrhizal roots with solid symbols. A, Hairy root specific growth rate (DW). B, *Glomus intraradices* specific spore production rate (spore number per dish). Growth model estimations: non-mycorrhizal (.....) and mycorrhizal (\_\_\_\_\_). (n=5). Error bars are 95% confidence intervals (SE).

1 mM Pi (Figure 4.1B). The root specific growth rate during the exponential growth phase were reduced sharply from  $0.068 \pm 0.012$  (SE)  $\text{d}^{-1}$  for an initial phosphate concentration of 0.12 mM Pi to  $0.041 \pm 0.006$  (SE)  $\text{d}^{-1}$  (0.04 mM Pi) and  $0.022 \pm 0.009$  (SE)  $\text{d}^{-1}$  (0.02 mM Pi) (Figure 4.2A), indicating that below 0.12 mM initial Pi, P is a limiting nutrient. However, no significant differences in the duration of the growth lag phase were observed between cultures for the initial Pi range studied (Figure 4.1A).

The observed slight decrease of the maximum specific root growth rates for initial phosphate concentrations above 0.12 mM may reveal some root growth inhibition by high exogenous phosphate as observed by Mosse and Phillips (1971).

There are evidences for a phosphate accumulation in the roots tissues in agreement with the literature (Bielecki and Fergusson, 1983; Lee and Ratcliffe, 1983; Clarkson, 1985; Lee et al. 1990; Lee and Ratcliffe 1993). The phosphate uptake was not related to roots growth since root growth continued after extracellular phosphate depletion (Figures 4.1A and 4.3B,D,F,G). There were also signs of nitrogen ( $\text{NO}_3$ ) accumulation by the non-mycorrhizal roots as root growth ceased almost 40 d after  $\text{NO}_3$  depletion of the culture media for 0.12 and 1 mM Pi conditions (Figures 4.1A and 4.3A,C,E). For 0.02 initial Pi concentrations root growth ceased close to nitrate depletion from the culture media. This nitrogen accumulation can be specific to carrot

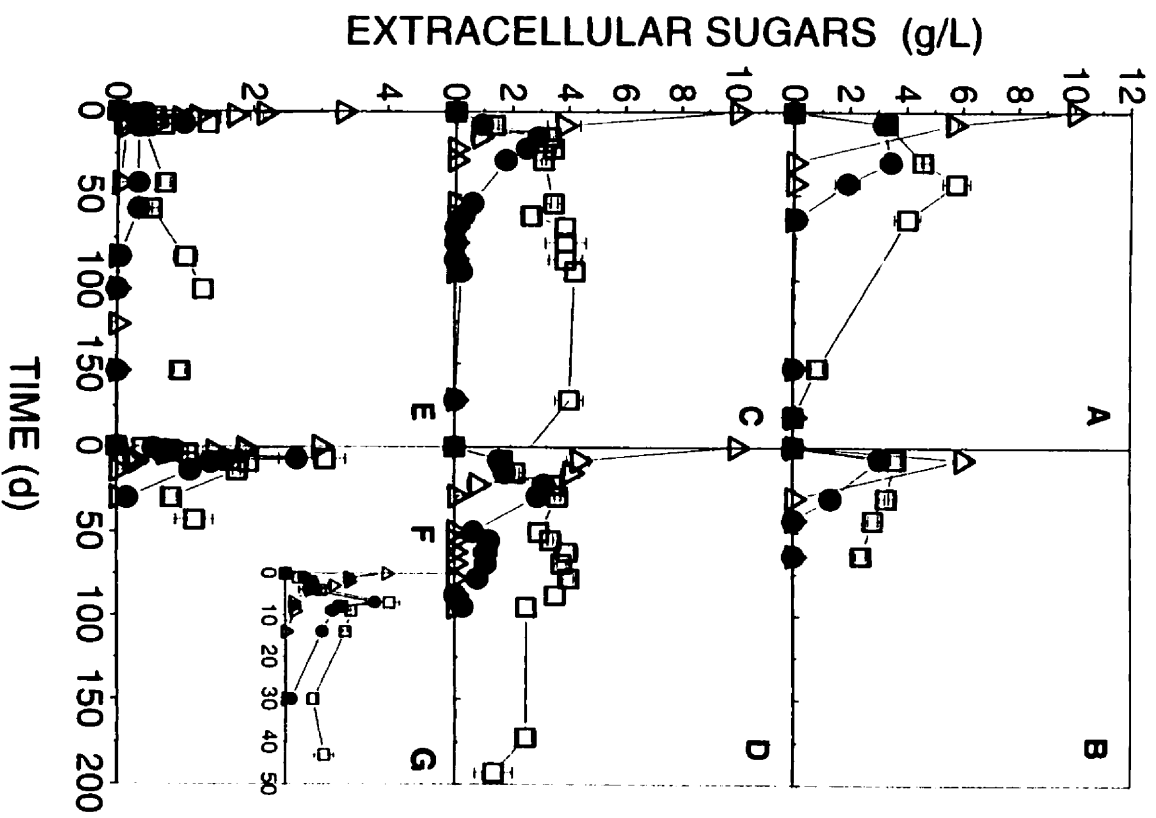


**Figure 4.3** Nitrate and Pi concentration in the culture medium during liquid cultures. Non-mycorrhizal hairy roots with hollow symbols and mycorrhizal roots with solid symbols. A and B, 1 mM initial Pi. C and D, 0.12 mM initial Pi. E and F, 0.02 mM initial Pi. G, Magnification of the same curves as (F) for the first 15 d. Growth model estimations: non-mycorrhizal (.....) and mycorrhizal (\_\_\_\_\_). (n=5). Error bars are standard deviations.

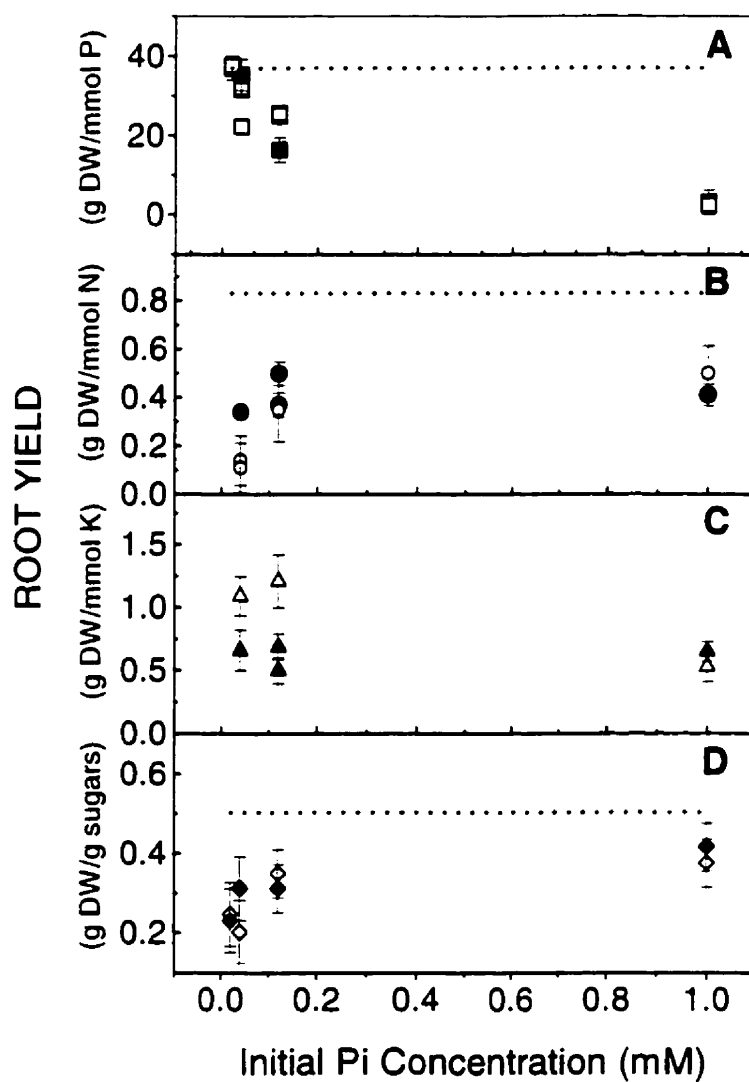
roots which are known to store high levels of nitrogen. Total sugars were not limiting during cultures (Figure 4.4). Sucrose hydrolysis occurs within 10 d at 0.02 initial Pi and within 20 d for higher Pi conditions. Glucose was preferentially consumed over fructose and glucose depletion have coincided with mycorrhizal and non-mycorrhizal root growth cessation without affecting spore production (Figure 4.1C, D). Other measured ions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) were not significantly consumed.

The root mass yield on phosphate (Figure 4.5A) increased with the decrease of the initial phosphate concentrations reaching a maximum value of  $37.04 \pm 2.74 \text{ g DW} \cdot \text{mmol}^{-1} \text{ P}$ . This maximum yield on phosphate was similar to that measured for P-exhausted conditions from elementary analysis (Table 4.1). This result thus confirms phosphorus to be the limiting nutrient for low concentrations of 0.02 and 0.04 mM Pi. Therefore, root inocula are not thought to have significant intracellular Pi storages. Yield on phosphate obtained from P-exhausted conditions should be considered as the actual yield and lower yield values may show unused stored Pi.

Root yield on nitrogen and total sugars calculated from experimental data were constants for 0.12 mM Pi condition and above (Figure 4.5). Under phosphate limiting conditions root yields on nitrogen and total sugars decreased and root yield on potassium increased (Figure 4.5). In the case of nitrogen and sugars, yield decrease can be explained by some accumulation within root tissues and/or exudation in the culture media. Lee (1982) has observed sugar accumulation in barley and Graham et



**Figure 4.4** Sugars concentration in the culture medium during liquid cultures. A and B, 1 mM initial Pi. C and D, 0.12 mM initial Pi. E and F, 0.02 mM initial Pi. G, Magnification of the same curves as (F) for the first 50 d. Mycorrhizal roots (A,C,E). Non-mycorrhizal roots (B,D,F,G). Sucrose (Δ), Glucose (●), Fructose (□). (n=5). Error bars are standard deviations.



**Figure 4.5** Non-mycorrhizal and mycorrhizal hairy root yields. A, Inorganic phosphate. B, Nitrogen. C, Potassium. D, Total sugars. Non-mycorrhizal hairy roots with hollow symbols and mycorrhizal roots with solid symbols. (n=5). Elementary analysis (.....). Error bars are 95% confidence intervals (SE).

**Table 4.1** Elementary Analysis

(% are based on dry weight)

***Glomus intraradices* Extraradical Mycelia and Spores Network <sup>1</sup>**

0.183 ±0.033	% P	0.059 ±0.011	mmol P /g DW
3.193 ±0.331	% N	2.280 ±0.236	mmol N /g DW
31.1 ±1.7	% C	0.778 ±0.043	g sucrose/g DW

***Daucus carota* Non-Mycorrhizal Hairy Roots****P-Exhausted Conditions <sup>2</sup>**

0.085 ±0.005	% P	0.027 ±0.002	mmol P /g DW
1.685 ±0.165	% N	1.203 ±0.118	mmol N /g DW
20.150 ±1.050	% C	0.504 ±0.026	g sucrose/g DW

**P-Enriched Conditions <sup>3</sup>**

0.160 ±0.005	%	0.052 ±0.002	mmol P /g DW
1.470 ±0.049	%	1.049 ±0.035	mmol N /g DW
13.300 ±0.951	%	0.333 ±0.023	g sucrose/g DW

1. Spores and mycelia from dual-compartment solid media cultures (n=6)

2. Hairy roots from 6 months old liquid medium cultures at 0.02 mM Pi (n=6)

3. Hairy roots from 3 weeks old liquid medium cultures at 1 mM Pi (n=2)

Errors are standard deviations.

al. (1981) have observed an increase of sugars and amino acids exudation by sundangrass under P-starved conditions. Exudation, including lost of carbon through respiration, and accumulation phenomena may thus explain that yield values obtained from cultures were lower these calculated from elementary analysis (Table 4.1 and Figure 4.5). For the root yield on potassium, the low ion content of the M/3 culture media may have induced a lower potassium cytosolic concentration required to maintain the osmotic and electronegative potentials of roots cells. Potassium is generally not accumulated in plant cells (Lefebvre and Glass, 1982).

#### **4.5.2 Effect of mycorrhizal Colonization on Roots Growth and Symbiont Nutrition**

The roots behaved significantly differently when colonized (Myc) with *G. intraradices*. They expressed longer growth lag periods and the time delay decreased with respect to the initial phosphate concentration :  $48 \pm 6$  d (0.02 mM Pi),  $24 \pm 6$  d (0.12 mM Pi) (Figure 4.1A) and  $21 \pm 4$  d (1 mM Pi) (Figure 4.1B). Final root dry weights were slightly lower-to-similar for mycorrhizal roots at all initial Pi conditions.

The colonization of roots by *G. intraradices* induced a significant decrease of their specific growth rate from  $0.068 \pm 0.012$  d<sup>-1</sup> (NM) to  $0.063 \pm 0.016$  d<sup>-1</sup> (Myc) at 0.12 mM initial Pi, from  $0.041 \pm 0.006$  d<sup>-1</sup> (NM) to  $0.021 \pm 0.008$  d<sup>-1</sup> (Myc) at 0.04 mM



initial Pi, and from  $0.022 \pm 0.009 \text{ d}^{-1}$  (NM) to  $0.0049 \pm 0.0020 \text{ d}^{-1}$  (Myc) at 0.02 mM initial Pi.

Diop et al. (1992) did not observe any of these mycorrhization effects on the same carrot root line cultured with the AM fungus *Gigaspora margarita*. This difference of growth behaviour can be attributed to a late spore production for *G. margarita* as compared to *G. intraradices* for which spores are produced continuously (Chabot et al., 1992; this study). *G. intraradices* may thus have an earlier and higher nutrient demand such as for root sugars.

Mycorrhizal plants generally show a lower root mass and a lower root-to-shoot mass ratio than non-mycorrhizal plants. A reduction of root development for *Trifolium subterraneum* L. cv. Seaton Park was observed when colonized with *Glomus fasciculatum* or *Glomus tenue* (Wilson, 1984). Berta et al. (1990) observed a lower root-to-shoot ratio and an higher branching development for *Glomus* sp. E<sub>3</sub> mycorrhizal *Allium porrum* L. compared for non-mycorrhizal.

The exhaustion of nitrate of the culture media was delayed for mycorrhizal roots as compared to non-mycorrhizal (Figure 4.3A,C,E) and the nitrate accumulation observed for non-mycorrhizal was no longer significant. Therefore, nitrate may be the limiting nutrient for mycorrhizal root cultures. The phosphate uptake seemed faster for mycorrhizal than non-mycorrhizal for 0.12 and 0.02 mM Pi (Figure 4.3D,F,G).

The mycorrhizal roots showed yields similar to these of non-mycorrhizal roots (Figure 4.5). The yields of the mycorrhizal roots were not significantly biased by the mass of the fungus since the weight of the spores and their suspensor hyphae represented less than 3% of the mycorrhizal root dry weight (see Materials and Methods section) and since fungal vesicles were observed in less than 7% of root length (data not shown).

Fungal spore production behaved similarly for initial Pi concentrations above 0.02 mM (Figure 4.1B and 4.2B) as new spores were observed 50 d after inoculation and the maximum spore number was reached at ~150 to 200 d. For the 0.02 mM initial Pi concentration, the time delay for the beginning of the spore production was of ~75 to 100 d. The maximum specific spore production rate was also observed at 0.12 mM initial Pi. As a coincidence, Leigh et al. (1992) found the same concentration of 0.12 mM for pyrophosphate inducing the optimal vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase activity for oat.

The maximum spore specific production rate observed of  $0.042 \pm 0.0077$  (SE) d<sup>-1</sup> at 0.12 mM Pi was similar to that of 0.046 d<sup>-1</sup> measured for intraradical development of *Glomus mosseae* and *Glomus fasciculatum* in soybean by Pacovsky and Fuller (1986). The 0.02 and 1 mM Pi culture conditions both induced a significant inhibition of the specific spore production rate with  $0.025 \pm 0.0085$  (SE) and  $0.01 \pm 0.0014$  (SE) d<sup>-1</sup>, respectively. The mycorrhization inhibition at high external Pi is well established

even if the mechanisms are still unknown (Mosse and Phillips, 1971). Fungal vesicles were observed in less than 5% of the root length.

#### **4.5.3 The Growth Dual Model Development**

The objectives here were to propose and validate the conceptual basis of a structured model for the respective growth of non-mycorrhizal and mycorrhizal (*G. intraradices*) *D. carota* roots.

Experimental results clearly showed an effect of initial extracellular Pi content on root and AM fungus growth rates. This external Pi effect may be seen as a concentration effect (transport systems affinity effect) or an effect of the total available quantity. Pi was rapidly accumulated by both organisms until its depletion since Petri dish is a closed system.

At Pi depletion of the culture media, intracellular Pi is distributed within a free cytosolic Pi, for both AM fungus and root, and a storage Pi pool : as Pi within vacuoles for root cells (Bielecki and Fergusson, 1983) and principally as polyphosphates for the fungus (Beever and Burns, 1980; Cox et al., 1980). The free cytosolic Pi pool has been observed to remain constant for plant cells from 5 to 20 mM (Bielecki, 1973; Lee and Ratcliffe, 1983) as well as for fungi (Beever and Burns, 1980; Bielecki and Fergusson, 1983). The storage capacity seems to be limited for plant cells as vacuolar Pi concentrations above 20 to 35 mM have been observed to be

toxic for the cells. For fungi, polyphosphate have been observed to account for 0.8% of the hyphal volume (Cox, 1980) and 3% of the dry weight (2.5 mmol per gram dry weight) (Bielecki and Fergusson, 1983). Since the fungus is in close contact with root intracellular Pi pools, through the arbuscules and intraradical hyphae (within intercellular space), as well as with its own Pi pools, it is thought that one of the keys in the regulation of the symbiosis (stimulation or inhibition) is related to the concentration gradients and dynamics of Pi pools between the root and the fungus. Taking all above together, the following hypotheses can be formulated.

#### *4.5.3.1 Hypotheses for Model Development*

1. AM fungus and root intracellular phosphate pools and host root soluble sugars contents are the major nutritional parameters controlling the symbiotic dynamic between the AM fungus *G. intraradices* and the *D. carota* root as host;
2. The AM fungi will transfer phosphate to the root only if its phosphate storages are non-exhausted and if the root intracellular phosphate storages are exhausted.

#### *4.5.3.2 Dual Model Assumptions*

The model is designed by the use of constant uptake kinetics parameters and yield coefficients for both the roots and the fungus. Cell material composition is also assumed to be constant. Homogeneous conditions are assumed in both fungal and root tissues as well as for the culture media volume. However, all differential

equations of the model are taken as partial derivatives to keep in mind that spatial dependency may also exist.

Intracellular Pi is defined as  $P_r$  (roots) and  $P_c$  (AM fungus) which are distributed into two metabolic fractions: free cytosolic ( $P_{i,r}$  and  $P_{i,c}$ ) and stored ( $P_{r,s}$  and  $P_{c,s}$ ), and non-metabolic pools defined as  $Y_{p/r}$  and  $Y_{p/c}$ . All cytosolic concentrations and yields are considered constant in roots and AM fungus tissues. New Pi entering the cells stays as free Pi, as long as the free Pi concentration is below a maximum set-point value ( $P_{i,r,max}$  and  $P_{i,c,max}$ ), or goes into storages. First order kinetics is proposed, as a first approximation, for the incorporation of Pi into  $P_{r,s}$  and  $P_{c,s}$  and for the reverse reaction (at the same rate). These phenomena are rapid relative to growth rates as it has been described for fungi (Bielecki, 1973; Beever and Burns, 1980; Cox et al., 1980; Capaccio and Callow, 1982) and for plant cells (Lefebvre and Clarkson, 1984; Glund et al., 1990; Macklon et al., 1996). Once the critical Pi concentration ( $P_{r,crit}$ ) is reached, both transport systems (high and low affinity) reduce their uptake of Pi to the maintenance rate. The translocation of Pi from the fungus to the root is arbitrarily described by a first order kinetic and occurs only if  $P_{c,s} > 0$  and  $P_{r,s} = 0$  (from the second hypothesis stated above).

The *G. intraradices* extraradical growth is expressed in term of spore number since the hyphal length to spore ratio was observed to be constant: -0.672 mm of hyphae per spore ( $r^2=0.998$ ; data not shown). Fungal and roots growths are driven by

cytosolic  $P_i$  and intracellular soluble sugars. As for  $P_{i,r}$ , a critical concentration of intracellular soluble sugars is fixed. From the literature stating a reduction of mycorrhization for P-fertilized conditions (Mosse and Phillips, 1971; Waterer and Coltman, 1988; Johnson, 1993),  $P_{r,s}$  is defined as the decision switch for spore production. A non-zero  $P_{r,s}$  value is considered to represent an inhibitory signal for the fungus.

#### 4.5.3.3 Biokinetic Dual Model Description

From the liquid culture results and the above assumptions, a dual model is formulated to describe the growth of mycorrhizal roots and their AM fungus symbiont.

##### Root Growth

$$\frac{\partial X_r}{\partial t} = \mu_r \cdot X_r \quad (4.2)$$

with (4.3)

$$\mu_r = \mu_{r,\max} \cdot (1 - e^{-K_1 \cdot P_{i,r}}) \cdot (1 - e^{-K_2 \cdot S_{i,r}}) \cdot \frac{NO_3}{NO_3 + K_3} \cdot \frac{K_{PP}}{K_{PP} + P_i^{inhi Pr}}$$

the specific root growth rate (dry weight), a function of extraradical nitrate concentration and roots' cytosolic  $P_i$  of the metabolic pool and total soluble sugars

( $S_{i,r}$ ) from Teissier kinetics (Toda and Yabe, 1979; Pazoutova et al., 1981). From the hypotheses proposing intracellular Pi and sugars as the key nutrients involved in the mycorrhization regulation, root growth rate is based on cytosolic Pi and sugars concentrations. An extraradical phosphate concentration inhibition term ( $K_{pp}$  group) is added to describe the phosphate toxicity effect at high external concentrations (Epstein, 1972, cited by Bielecki and Fergusson, 1983) as observed in Figure 4.2A. Since nitrate was suggested to be a limiting nutrient for mycorrhizal root cultures and accumulated for non-mycorrhizal cultures (Figure 4.1A,B and 4.3A,C,E) a Monod kinetics based on extracellular nitrate concentration is arbitrarily proposed in order to limit the model study to a phenomenon of Pi and soluble sugars accumulation.

#### *AM Fungus Growth*

$$\frac{\partial X_{c,e}}{\partial t} = q_{c,e} \cdot X_{c,e} \quad (4.4)$$

where  $X_{c,e}$  is total spores per Petri dish, and

$$q_{c,e} = q_{c,e,\max} \cdot \frac{K_p}{K_p + P_{r,s}^{inhi}} \cdot (1 - e^{-K_{c,e,p} \cdot P_{i,c}}) \cdot (1 - e^{-K_{c,e,s} \cdot S_{i,c}}) \quad (4.5)$$

the spore number specific production rate, a function of the fungus cytosolic  $P_{i,c}$  of the metabolic pool and total soluble sugars ( $S_{i,c}$ ) following Teissier kinetics. An

inhibition term ( $K_p$  group) based on roots' phosphate storages concentration is added in order to describe the fungal growth inhibition observed for high phosphate external concentration (Waterer and Coltman, 1988; Johnson, 1993). Buwalda et al. (1982) and Pacovsky and Fuller (1986) have also proposed an exponential growth model for intraradical development.

### *Phosphate in the Culture Medium*

Phosphate uptake occurs simultaneously in the roots and the fungus. Uptake rates are described by two Michaelis-Menten kinetics with a high affinity (I) and a low affinity (II) uptake systems for both the roots (Cress et al., 1979; Drew et al., 1984) and the fungus (Thompson et al., 1990; Harisson and Van Buuren, 1995). The spore number is converted into g DW of spores and associated hyphal network by the factor  $X_{c,e,DW}$  having a value of  $1.917 \times 10^{-7}$  g DW•spore<sup>-1</sup> (see Materials and Methods section).

$$\begin{aligned} \frac{\partial P_i}{\partial t} = & - \left[ V_{\max,I,r} \cdot \frac{P_i}{K_{m,I,r} + P_i} + V_{\max,II,r} \cdot \frac{P_i}{K_{m,II,r} + P_i} \right] \cdot \frac{X_r}{V} \quad (4.6) \\ & - \left[ V_{\max,I,c,e} \cdot \frac{P_i}{K_{m,I,c,e} + P_i} + V_{\max,II,c,e} \cdot \frac{P_i}{K_{m,II,c,e} + P_i} \right] \cdot X_{c,e} \cdot \frac{X_{c,e,DW}}{V} \end{aligned}$$



### Root Intracellular Phosphate

$$\frac{\partial P_r}{\partial t} = \left[ V_{\max, I, r} \cdot \frac{P_i}{K_{m, I, r} + P_i} + V_{\max, II, r} \cdot \frac{P_i}{K_{m, II, r} + P_i} \right] - \left( Y_{P/r} + P_r \right) \cdot \mu_r \quad (4.7)$$

$$- m_r + V_{\max, i, c, r} \cdot P_{i, c} \cdot X_{c, e} \cdot \frac{X_{c, e, DW}}{X_r}$$

where the new phosphate intake increases or maintain the  $P_{i, r}$  metabolic pool ( $P_r$ ). A part of this pool supports the growth (second term) and a part goes to the maintenance (third term). The last term describes  $P_i$  translocation from the AM fungus to the root which is considered to be unidirectional. No time delay is added between the intake of  $P_i$  and the translocation to the root since the intracellular transport velocity has been observed to be fast (cm per seconds to minutes) (Jennings, 1994) as compared to growth rates ( $d^{-1}$ ).

### AM Fungus Intracellular Phosphate

$$\frac{\partial P_c}{\partial t} = \left[ V_{\max, I, c, e} \cdot \frac{P_i}{K_{m, I, c, e} + P_i} + V_{\max, II, c, e} \cdot \frac{P_i}{K_{m, II, c, e} + P_i} \right] - \left( Y_{P/c} + P_c \right) \cdot q_{c, e}$$

$$- V_{\max, i, c, r} \cdot P_{i, c} \quad (4.8)$$

where the new phosphate intake goes primarily to maintain the  $P_{i,c}$  metabolic pool ( $P_c$ ). A part of this pool supports the production of new AM fungus spores (second term). The efflux term of  $P_i$  translocation from the AM fungus to the root is described in the third term. No term for maintenance is added.

#### *Nitrate Concentration in the Culture Medium*

AM fungus and its host root are thought to be equipped to uptake nitrate from the culture medium (Bago et al., 1996; Pfeffer et al., 1998). As discussed above, nitrate is arbitrarily considered as growth related without any accumulation. No nitrate translocation is taken into account between symbionts in order to validate the  $P_i$  and sugars parameters as key factors even if there are evidences for N translocation in AM symbiosis (Pfeffer et al., 1998).

$$\frac{\partial NO_3}{\partial t} = -\mu_r \cdot X_r \cdot Y_{N/r} \cdot \frac{1}{V} - Y_{N/c} \cdot q_{c,e} \cdot X_{c,e} \cdot X_{c,e,DW} \cdot \frac{1}{V} \quad (4.9)$$

#### *Carbon Sources*

The next differential equation describes the total sugars concentration of the culture medium. The first term (*hydro*) represents the sucrose (in the medium) rate of hydrolysis into glucose and fructose. Roots are not considered to be competent for

sucrose uptake from experimental data. The  $S$  variable thus represents the glucose and fructose combined concentration in the culture media. A single Michaelis-Menten uptake kinetics is proposed for sugar uptake by the roots. A criterion of critical intracellular sugars concentration ( $S_{r, crit}$ ) is imposed above which the sugar uptake is stopped.

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \left[ r_{hydro} - V_{\max, I, r, s} \cdot \frac{S}{K_{m, I, r, s} + S} \right] \cdot \frac{X_r}{V} \quad (4.10)$$

#### *The Root Intracellular Soluble Sugars*

$$\frac{\partial S_{i, r}}{\partial t} = V_{\max, I, r, s} \cdot \frac{S}{K_{m, I, r, s} + S} - \left( Y_{S/r} + S_{i, r} \right) \cdot \mu_r \quad (4.11)$$

$$- V_{\max, s, c} \cdot \frac{S_{i, r}}{K_{m, I, c, s} + S_{i, r}} \cdot X_{c, e} \cdot \frac{X_{c, e, DW}}{X_r} - m_{r, S}$$

Where  $m_{r, S}$  represents the maintenance energy on sugars. The uptake term (first) is fixed to zero when  $S_{i, r} \geq S_{r, crit}$ . The third term corresponds to the sugar losses to the AM fungus which is considered to be unidirectional since sugars are transformed into less diffusible forms such as mannitol and trehalose (Bécard et al., 1991).

### *The AM Fungus Intracellular Soluble Sugars*

$$\frac{\partial S_{i,c}}{\partial t} = V_{\max,s,c} \cdot \frac{S_{i,r}}{K_{m,I,c,s} + S_{i,r}} - \left( \frac{Y_S}{c} + S_{i,c} \right) \cdot q_{c,e} \quad (4.12)$$

Where, as for  $P_{i,c}$ , no term of maintenance is added.

### *Medium Liquid Volume*

$$\frac{\partial V}{\partial t} = -\mu_r \cdot X_r \cdot DW_r - Evap \quad (4.13)$$

Where  $DW_r$  is the wet-to-dry weight ratio converting the root mass increase in liquid medium water loss and having a value of  $9 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$ . The  $Evap$  constant is the evaporation rate of 7 mL per 120 days measured in Petri dish liquid cultures sealed with two Parafilm (American National Can, Neenah, WI, USA) layers.

## **4.5.4 Growth Model Calibration and Behaviour**

### *4.5.4.1 Simulation of Hairy Roots Growth*

The number of unknown parameters of the dual model is relatively high (Table 4.2). The model was first calibrated for the non-mycorrhizal roots case. The maximum specific growth rate ( $\mu_{r, \max}$ ) was taken from literature for *D. carota* roots with a value

of  $0.24 \text{ d}^{-1}$  (Taya et al., 1989). Approximations of the root maximum cytosolic phosphate concentration ( $P_{i, r, \max}$ ) of  $0.0497 \text{ mmol Pi} \bullet \text{g}^{-1} \text{ DW}$  (5.55 mM) and of the critical intracellular phosphate concentration ( $P_{r, \text{crit}}$ ) of  $0.169 \text{ mmol Pi} \bullet \text{g}^{-1} \text{ DW}$  (18.8 mM) were determined from root intracellular analysis (Table 4.3). The critical Pi concentration corresponded to vacuolar toxic concentration of 20 to 35 mM observed as found by Bielecki (1973) and Clarkson (1985). The critical cytosolic concentration for soluble sugars ( $S_{r, \text{crit}}$ ) was set at  $0.11 \text{ g sugar} \bullet \text{g}^{-1} \text{ DW}$  from intracellular content measurements (Table 4.3) which corresponds to literature data for *Paspalum notatum* with  $0.105 \text{ g sugar} \bullet \text{g}^{-1} \text{ DW}$  (Douds and Schenck, 1990) and for oat with  $0.125 \text{ g sugar} \bullet \text{g}^{-1} \text{ DW}$  (Livingston and Henson, 1998). The sucrose hydrolysis rate of  $0.61 \text{ g sugar} \bullet \text{g}^{-1} \text{ DW} \bullet \text{d}^{-1}$  and sugars uptake rate observed from the liquid cultures were considered (not shown).

Table 4.2 Kinetic Parameters

Variable	Value	Units	Reference
<b><i>D. carota</i> hairy roots</b>			
$\mu_{r\max}$	0.24	$d^{-1}$	Taya et al.(1989)
$P_{ir\max}$	0.0497	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW$	Experimental
$P_{r\ crit}$	0.169	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW$	"
$S_{r\ crit}$	0.11	$g\ sugars \cdot g^{-1}\ DW$	Experimental
$Y_{P/R}$	0.027	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW$	"
$Y_{N/R}$	1.06	$mmol\ N \cdot g^{-1}\ DW$	"
$Y_{S/R}$	0.38	$g\ sugars \cdot g^{-1}\ DW$	Estimated from model
$K_1$	9.17	$g\ DW \cdot mmol^{-1}\ Pi$	"
$K_2$	0.18	$g\ DW \cdot mmol^{-1}\ nitrate$	"
$K_3$	12.92	$g\ DW \cdot g^{-1}\ sugars$	"
$K_{pp}$	0.90	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW$	"
$inhipr$	1.87	Dimensionless	"
$\mu_{hydro}$	0.61	$g\ sugars \cdot g^{-1}\ DW \cdot d^{-1}$	Experimental
$V_{max, i, r, S}$	0.04	$g\ sugars \cdot g^{-1}\ DW \cdot d^{-1}$	"
$K_{m, i, r, S}$	0.8	$g\ sugars \cdot g^{-1}\ DW$	"
$V_{max, i, r}$	0.0076	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW \cdot d^{-1}$	Estimated from model
$K_{m, i, r}$	0.0018	$mmol\ Pi \cdot L^{-1}$	"
$V_{max, ii, r}$	0.019	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW \cdot d^{-1}$	"
$K_{m, ii, r}$	2.00	$mmol\ Pi \cdot L^{-1}$	"
$m_r$	0.00058	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW \cdot d^{-1}$	"
$m_{rS}$	0.00062	"	"
<b><i>G. intraradices</i> AM fungus</b>			
$q_{asmax}$	0.053	$d^{-1}$	Experimental
$P_{ic\max}$	0.015	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW$	Beever and Burns (1980)
$S_{c\ crit}$	0.11	$g\ sugars \cdot g^{-1}\ DW$	Experimental
$Y_{P/ic}$	0.0029	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW$	Estimated from model
$Y_{N/ic}$	2.28	$mmol\ N \cdot g^{-1}\ DW$	Experimental
$Y_{S/ic}$	0.12	$g\ sugars \cdot g^{-1}\ DW$	Estimated from model
$inhi$	3.12	Dimensionless	"
$K_D$	8.06E-10	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW$	"
$K_{asp}$	82.71	$g\ DW \cdot g^{-1}\ Pi$	"
$K_{oss}$	11.41	$g\ DW \cdot g^{-1}\ sugars$	"
$V_{max, i, ce}$	0.0028	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW \cdot d^{-1}$	Experimental
$K_{m, i, ce}$	0.001	$mmol\ Pi \cdot L^{-1}$	Thomson et al. (1990)
$V_{max, ii, ce}$	0.06	$mmol\ Pi \cdot g^{-1}\ DW \cdot d^{-1}$	Fixed
$K_{m, ii, ce}$	12	$mmol\ Pi \cdot L^{-1}$	Fixed
<b>Translocation parameters</b>			
$K_{m, i, cs}$	0.0026	$g\ sugars \cdot g^{-1}\ DW$	Estimated from model
$V_{max, i, cs}$	3.22	$g\ sugars \cdot g^{-1}\ DW \cdot d^{-1}$	"
$V_{max, i, cr}$	0.0035	$g\ Pi \cdot g^{-1}\ DW \cdot d^{-1}$	"

**Table 4.3** *Daucus carota* Intracellular Concentrations

	mmol / g DW	mM
PO <sub>4</sub>	.0497 <sup>1</sup> to 0.169 <sup>2</sup> ±0.02	5.55 to 18.8 ±1.95
Total Soluble Sugars	0.11 <sup>3</sup> ±0.02 g • g <sup>-1</sup> DW	

---

1. 3 weeks old non-mycorrhizal hairy roots from shake flask cultures using MW medium (n=6)
2. 1 week old non-mycorrhizal hairy roots (n=8)
3. Mean value of 1 and 3 weeks old non-mycorrhizal hairy roots (n=8)

---

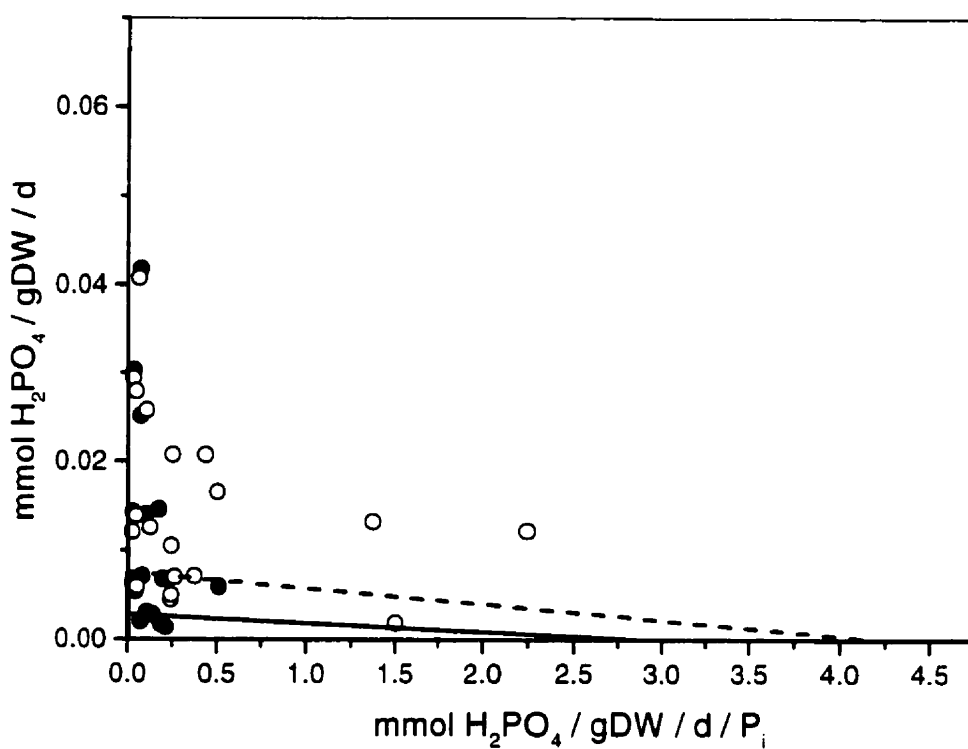
Root yield on phosphate ( $Y_{Pr}$ ) was taken as 0.027 mmol P • g<sup>-1</sup> DW from long term P-exhausted conditions from elementary analysis. This  $Y_{Pr}$  value is thought to represent the cellular material non-metabolic phosphate pool. The root yield on nitrogen obtained at high initial Pi liquid cultures was considered in the model because it contains the contribution of maintenance and nitrogen losses through exudation of amino acids and other compounds (Graham et al. 1981; Merryweather and Fitter, 1995). Root yield on sugars measured from liquid cultures was thought to be overestimated because of an hidden contribution to maintenance and multiple losses (CO<sub>2</sub>, amino acids, etc.).  $Y_{Sr}$  and all other parameters were thus estimated through the model calibration step. The convergence criterion was based on the minimisation of the sum of the squares of the errors of the maximum root specific growth rate ( $\mu_r$

measured and estimated from equation (4.2)) and the maximum final root dry mass ( $X_r$ , measured and estimated from equation (4.1)).

Model simulations resulted in a root yield on sugars of  $0.38 \text{ g sugars} \bullet \text{g}^{-1} \text{ DW}$  (Table 4.2) which was 1.31 time lower than that obtained from elementary analysis (Table 4.1) but, interestingly, similar to that measured from liquid cultures (Figure 4.5D). The estimates for the high and low affinity Pi uptake system (Table 4.2) were within the range of the experimental data (Figure 4.6). Maintenance values for phosphate and sugars representing less than 5% and 0.5% of the phosphate and sugars uptake rates respectively, were estimated by the model.

Using the initial conditions of the liquid cultures in Petri dish, the growth model predicted the observed specific growth rates (Figure 4.2A) as well as the final root dry mass (Figure 4.1A). However, the model could not predict the rapid root dry weight decrease usually observed in the days following inoculation nor the root mass decrease after the growth stationary phase. The model was not able to predict the nitrate consumption (Figure 4.3A,C,E). The prediction of phosphate consumption was not more satisfactory (Figure 4.3B,D,F,G).





**Figure 4.6** The Hofstee plot of the relationship between Pi concentration and uptake rate for non-mycorrhizal hairy roots (hollow symbols) and mycorrhizal roots (solid symbols). High affinity uptake system: *D. carota* hairy roots estimated by the model (- - - -) and *Glomus intraradices* fungus (\_\_\_\_\_).

#### 4.5.4.2 Simulation of AM fungus and Hairy Roots Growth

Keeping constant the root kinetic parameters, the AM fungus *G. intraradices* was introduced into the dual model. The maximum specific spore production rate was taken as  $0.053 \text{ d}^{-1}$  (not shown data). The AM fungus maximum cytosolic phosphate concentration was taken from *Neurospora crassa* with a value of  $0.015 \text{ mmol Pi} \bullet \text{g}^{-1} \text{ DW}$  or  $6 \text{ mM}$  (Beever and Burns, 1980). The same critical intracellular concentration for soluble sugars as that of the roots was arbitrarily considered. Fungal yields on phosphate, nitrogen and sugars measured from elementary analysis were only considered as initial values for the model simulation steps. The  $V_{\max, I, c, e}$  parameter of the high affinity uptake system for phosphate was taken as  $0.028 \text{ mmol P} \bullet \text{g}^{-1} \text{ DW} \bullet \text{d}^{-1}$  (data not shown) and the  $K_{m, I, ce}$  parameter was arbitrarily fixed lower than that of the root at  $1 \text{ } \mu\text{M}$ . This value was lower than that of  $1.8 \text{ } \mu\text{M}$  measured for *Gigaspora margarita* (Thomson et al., 1990). The low affinity parameters ( $V_{\max, II, c, e}$  and  $K_{m, II, ce}$ ) observed for *Gigaspora margarita* (Thomson et al., 1990) were considered. All other parameters were estimated through the model calibration step. For the dual model including both symbiotic partners, the convergence criterion was based on the minimisation of the product of the squares of the errors of the maximum root specific growth rate by the maximum final root dry mass by the maximum spore specific production rate ( $q_{c,e}$  measured and estimated from equation (4.4)) and by the maximum final spore production (*Spores* measured and estimated from equation (4.3)). Minimising a product had the effect of giving the same weight on each error

term even for the square of the error on spore production which can be as high as  $10^6$  at the beginning of the simulation.

Model convergence required to lower the fungal yields on phosphate (1/20.15) and on sugars (1/6.28) related to those measured from elementary analysis (Tables 4.1 and 4.3). The low affinity Pi uptake system estimated was within the range of the experimental data (Figure 4.6). Roots high affinity constants measured from liquid cultures and estimated by the model showed lower values than those found in literature with  $1.8 \mu\text{M Pi}$  as compared to  $3.1 \mu\text{M Pi}$  for carrot roots (Itoh and Barber, 1983) and  $3.9 \mu\text{M Pi}$  for tomato roots (Cress et al., 1979). However, hairy root uptake behaviour may differ from plant roots. The estimations of maximum high affinity and low affinity uptake rates of  $0.0076$  and  $0.018 \text{ mmol Pi} \cdot \text{g}^{-1}\text{DW} \cdot \text{d}^{-1}$  were 3 times lower than for tomato roots (Table 4.2).

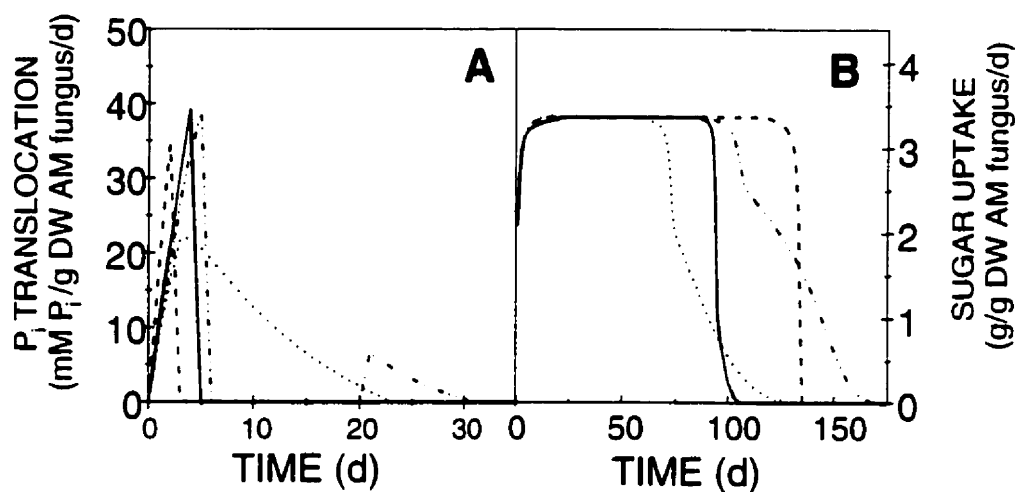
The model even predicts, as observed experimentally, the lower root specific growth rate for the mycorrhizal roots at low initial Pi concentrations (Figure 4.2A). The estimated mycorrhizal root final dry mass was 3% lower than that of non-mycorrhizal which was not detectable through dry weight measurements. This decrease in root dry weight of 3% corresponded to the maximum fungus mass production at  $0.12 \text{ mM Pi}$ . The lower growth rate estimates induced a time delay that was too short to match with experimental data (Figure 4.1A,B). As for non-mycorrhizal roots the model could not

predict the rapid root dry weight decrease nor the root mass decrease after the growth stationary phase.

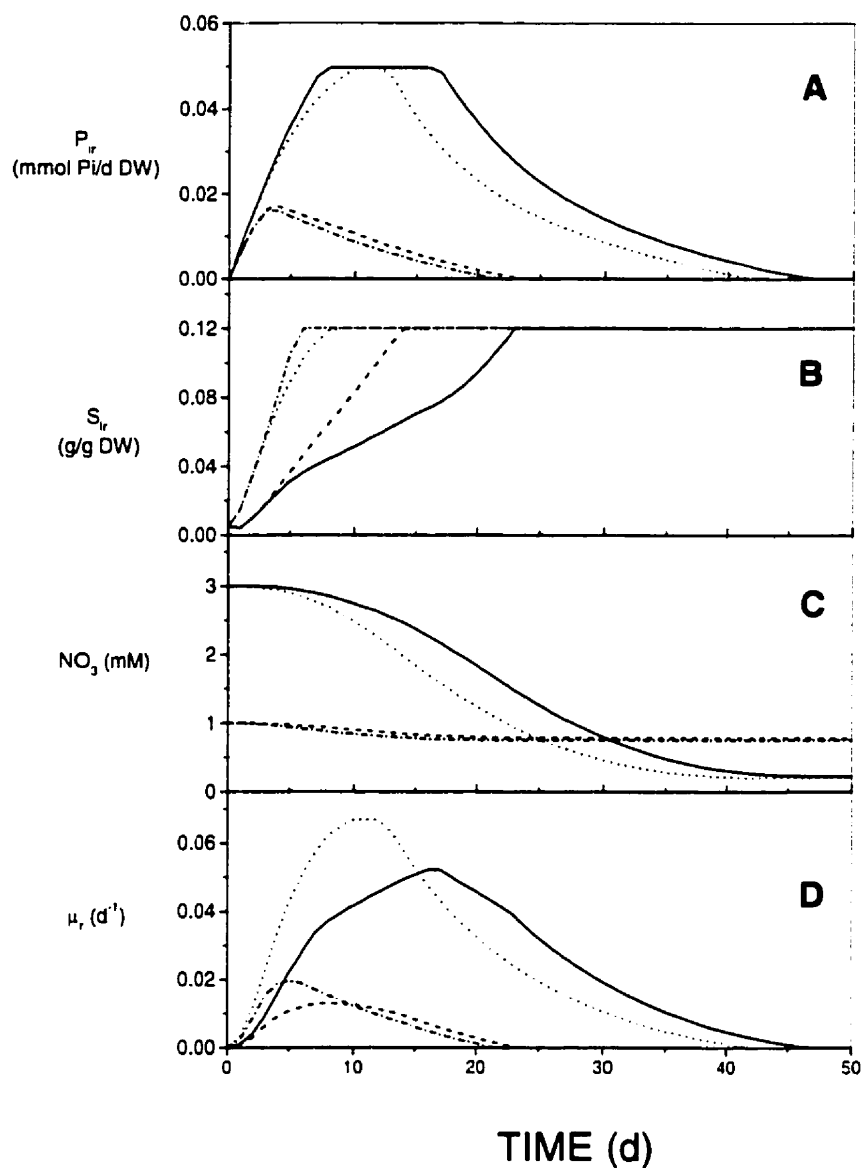
The model was able to predict the Pi uptakes for mycorrhizal roots (Figure 4.3B,D,F,G). For nitrate, the predictions of the uptake followed the experimental data except for the 0.02 mM Pi culture. The equation (4.9) of the model describing nitrate uptake was fixed as growth related without any terms of accumulation. The model thus proved to predict nitrate uptake under conditions of non-accumulation.

The prediction of the specific spore production rates was within the standard error of the experimental data (Figure 4.2B). The stepwise behaviour of the model in  $q_{c,e}$  estimations (Figure 4.2B) is due to the  $q_{c,e}$  dependency on intracellular  $P_{i,c}$  and  $S_{i,c}$  which can saturate to their maximum fixed values ( $P_{i,c,max}$  and  $S_{i,c,crit}$ ). However, estimated spore productions were delayed to ~200 d for 1 mM initial Pi (Figure 4.1B). Estimated phosphate translocation from the fungus to the root occurred mainly at the beginning of the cultures (Figure 4.7A) in contrast with sugars translocation which was effective until the exhaustion of root intracellular sugars (Figure 4.7B).

The roots specific growth rate is defined in equation (4.2) as a function of the root mean cytosolic  $P_{i,r}$  and  $S_{i,r}$  concentrations and the liquid medium nitrate concentration. Model simulations suggested that the fungal translocation of  $P_i$  to the root (Figure 4.7A) contributed to maintain higher estimated  $P_{i,r}$  concentrations in mycorrhizal roots compared to those estimated for the non-mycorrhizal roots (Figure 4.8A). The fungus



**Figure 4.7** Estimation of the translocation behaviour between the AM fungus and *D. carota* hairy root. A, Inorganic phosphate translocation from the AM fungus to the hairy root. B, Soluble sugars uptake by the AM fungus in the root. 0.02 mM  $P_i$  (....), 0.04 mM  $P_i$  (- · - · - ·), 0.12 mM  $P_i$  (\_\_\_\_), 1 mM  $P_i$  (- - - - -).



**Figure 4.8** Evolution of the estimated specific growth rate of hairy roots. A, Roots estimated cytosolic Pi concentration. B, Roots estimated intracellular sugars concentration. C, Culture media nitrate concentration. D, Roots specific growth rate. 0.02 mM Pi non-mycorrhizal (— · — · —) and mycorrhizal (- - - -), 0.12 mM Pi non-mycorrhizal (.....) and mycorrhizal (\_\_\_\_\_).

Pi uptake and the rapid Pi translocation to the root may explain the Pi exhaustion of the culture media which was faster for mycorrhizal than non-mycorrhizal roots (Figure 4.3B,D,F,G). The ability of the extraradical fungus to uptake nitrate from the culture medium did not increase total nitrate consumption which was even lower than that estimated for non-mycorrhizal roots, possibly because of the lower growth rate of the mycorrhizal roots (Figure 4.8C). For high 1 mM initial Pi concentration culture condition, nitrate and/or glucose was the limiting nutrient (Figures 4.1B and 4.3A) and the spore production predicted by the dual model was delayed until  $P_{r,s}$  (estimated) was depleted as compared to the experimental data (Figure 4.1D). In fact, the beginning of spore production always coincided with nitrate exhaustion of the culture media for all the cultures assessed. Nitrate deprivation has been seen to induce an increase of intracellular total sugars concentration (Lee, 1982). Smith (1980) and Thompson (1986) showed that the nitrogen sources ( $\text{NO}_3$  and  $\text{NH}_4$ ) have an effect on mycorrhization. From all the above results nitrate deprivation condition may act as another switch (as  $P_{r,s}$ ) inducing the root to release a signal stimulating the fungus activity despite an estimated high root sufficient phosphate ( $P_{r,s}$ ) content.

Roots are used to receive sucrose as carbon source but first require to hydrolyse it to glucose and fructose. This step was clearly not growth limiting since the hydrolysis rate was more than ten times faster than the sugars uptake rate with 0.61 and 0.044 g

sucrose  $\bullet g^{-1} DW \bullet d^{-1}$ , respectively. Sugar uptake by the fungus in the root is important enough quantitatively to decrease the root intracellular sugar concentration at the beginning of the cultures (Figure 4.8B). In fact, the fungus estimated sugar uptake rate is even higher than the maximum sugar uptake rate of the roots with  $0.096 g \text{ sucrose} \bullet g^{-1} DW \bullet d^{-1}$ . This uptake rate value could have been overestimated since no term of maintenance was added to the sugar mass balance for the fungus. The AM fungus uptake system is thus in competition with the root uptake capacity from the culture medium which was confirmed by Clarkson (1985) who observed that up to 10% of the photosynthate carbon goes to the AM fungus. Schellenbaum et al. (1998) and Sachar-Hill et al. (1995) have also observed a competition for intracellular sugars of maize plants colonized by *Glomus mosseae*. For the specific case of *G. intraradices* Douds and Schenck (1990) have observed spore production not to be related to roots intracellular soluble sugars concentration.

## 4.6 CONCLUSIONS

### 4.6.1 Growth Dual Model Development

The structure of the proposed dual model allows to describe the growth behaviour of both non-mycorrhizal and mycorrhizal roots. The dual model parameters are similar



to physiological values typically found in the literature. The root yield on sugars and roots Pi transport systems coefficients matched these obtained from experimental data. The assumption that Pi transport coefficients are constant has to be re-evaluated to take into account an adaptation mechanism of the high affinity system as observed in literature for plant roots (Clarkson et al., 1978; Lee et al., 1990; Torriani-Gorini et al., 1994) and fungi (Beever and Burns, 1980; Drew, 1984). However, the growth dual model developed proved to be effective to predict non-mycorrhizal root growth for higher initial Pi than 0.02 mM Pi, AM fungus spore production behaviour under Pi limiting conditions and nitrate and Pi uptake behaviours for mycorrhizal root cultures.

#### **4.6.2 Pi Intracellular Pools: a Key Parameter in Symbiosis Regulation**

Model simulation results have supported the hypothesis of the intracellular phosphate storages ( $P_{r,s}$ ) to be a decision switch for the AM fungus to grow ( $P_{r,s} = 0$ ) or to cease ( $P_{r,s} > 0$ ). This decision switch has conditioned the model behaviour by determining the root nutritional status required for the initiation of spore production. The ability of the model to predict experimental data thus suggests that Pi switch hypothesis is valid. This may offer a logical explanation to the observed negative effect of P fertilisation on mycorrhization.

### 4.6.3 Host Root Intracellular Sugars: AM Fungus is a Competitor

The dual model suggests a strong competition for the root intracellular sugars between the root cells and the AM fungus in agreement with Douds and Schenck (1990) who proposed the AM fungus to be an “opportunistic partner” when cultured *in vitro* on hairy roots. This result was not surprising since the AM fungus survival relies on its capacity to take up sugars from its host root.

The dual growth model was developed as an efficient tool to study the dynamics of the symbiosis. To our knowledge it is the first time that a structured model describing the regulation of mycorrhizal symbiosis is developed. Future work will focus on the improvement of the model by including a nitrate component as a decision switch in complement to intracellular Pi pools and the role of sugar storages will be studied. The dual model has been validated for the *D. carota* hairy roots and the AM fungus *G. intraradices* and will be applied to other AM fungi.

## 4.7 NOMENCLATURE

*DWr* : Dry-to-wet weight ratio converting the root mass increase in liquid medium water loss and having a value of 0.1 [g DW • g<sup>-1</sup> WW]

- Evap* : Evaporation rate measured in Petri dish liquid cultures with a value of 7 mL per 120 days [ $\text{mL} \bullet \text{d}^{-1}$ ]
- inhi* : AM fungus growth inhibition index on extracellular phosphate
- inhiPr* : Hairy roots growth inhibition index on extracellular phosphate
- $K_1$  : Root growth rate constant associated with the intracellular phosphate concentration [ $\text{g DW} \bullet \text{mmol}^{-1} \text{Pi}$ ]
- $K_2$  : Root growth rate constant associated with the intracellular sugars concentration [ $\text{g DW} \bullet \text{g}^{-1} \text{sugars}$ ]
- $K_3$  : Root growth rate constant associated with the extracellular nitrate concentration [ $\text{g DW} \bullet \text{mmol}^{-1} \text{NO}_3$ ]
- $K_{c,e,s}$  : Fungus growth rate constant associated with the intracellular sugars concentration [ $\text{g DW} \bullet \text{g}^{-1} \text{sugars}$  ]
- $K_{c,e,p}$  : Fungus growth rate constant associated with the intracellular phosphate concentration [ $\text{g DW} \bullet \text{mmol}^{-1} \text{Pi}$ ]
- $K_{m,l,c,e}$  : AM fungus high affinity uptake constant for phosphate ion [ $\text{mmol Pi} \bullet \text{L}^{-1}$  ]

- $K_{m, ll, c, e}$  : AM fungus low affinity uptake constant for phosphate ion  
[mmol Pi  $\bullet$  L<sup>-1</sup> ]
- $K_{m, l, r}$  : Hairy roots high affinity uptake constant for phosphate ion  
[mmol Pi  $\bullet$  L<sup>-1</sup> ]
- $K_{m, ll, r}$  : Hairy roots low affinity uptake constant for phosphate ion  
[mmol Pi  $\bullet$  L<sup>-1</sup> ]
- $K_{m, l, c, s}$  : AM fungus affinity constant for sugars uptake from the root cells  
[g sugars  $\bullet$  g DW<sup>-1</sup> ]
- $K_{m, l, r, s}$  : Hairy roots affinity constant for sugars uptake [g sugars  $\bullet$  L<sup>-1</sup> ]
- $K_p$  : AM fungus growth inhibition constant on extracellular phosphate  
concentration [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $K_{pp}$  : Hairy roots growth inhibition constant on extracellular phosphate  
concentration [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $m_r$  : Hairy root maintenance on phosphate [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $m_{r, s}$  : Hairy root maintenance on sugars [g sugars  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]

- $NO_3$  : Extracellular nitrate concentration [mmol  $NO_3 \bullet L^{-1}$ ]
- $P_i$  : Medium inorganic phosphate concentration [mmol Pi  $\bullet L^{-1}$ ]
- $P_r$  : Hairy roots total intracellular inorganic phosphate concentration  
[mmol Pi  $\bullet g^{-1}$  DW]
- $P_{i,r}$  : Hairy roots intracellular inorganic phosphate concentration  
[mmol Pi  $\bullet g^{-1}$  DW]
- $P_{r,s}$  : Hairy roots intracellular storages of inorganic phosphate  
[mmol Pi  $\bullet g^{-1}$  DW]
- $P_{i,r,max}$  : Hairy roots maximum intracellular concentration of inorganic phosphate  
[mmol Pi  $\bullet g^{-1}$  DW]
- $P_{r,crit}$  : Hairy roots critical intracellular concentration of inorganic phosphate  
[mmol Pi  $\bullet g^{-1}$  DW]
- $P_c$  : AM fungus total intracellular storages of inorganic phosphate  
[mmol Pi  $\bullet g^{-1}$  DW]
- $P_{i,c}$  : AM fungus intracellular storages of inorganic phosphate  
[mmol Pi  $\bullet g^{-1}$  DW]

- $P_{c,s}$  : AM fungus intracellular storages of inorganic phosphate  
[mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $P_{i,c,max}$  : AM fungus maximum intracellular concentration of inorganic phosphate  
[mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $q_{c,e}$  : Specific spore production rate [d<sup>-1</sup>]
- $q_{c,e,max}$  : Maximum specific spore production rate [d<sup>-1</sup>]
- $r_{hydro}$  : Sucrose specific hydrolysis rate by hairy root [g sucrose  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]
- $S$  : Total extracellular sugars concentration [g sugars  $\bullet$  L<sup>-1</sup> ]
- $S_{i,c}$  : AM fungus intracellular sugars concentration [g sugars  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW ]
- $S_{c,crit}$  : AM fungus critical intracellular sugars concentration  
[g sugars  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW ]
- $S_{i,r}$  : Hairy roots intracellular sugars concentration [g sugars  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW ]
- $S_{r,crit}$  : Hairy roots critical intracellular sugars concentration  
[g sugars  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW ]

$V$  : Liquid medium volume [L]

$V_{max, I, c, e}$  : AM fungus high affinity maximum specific uptake rate  
[mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]

$V_{max, II, c, e}$  : AM fungus low affinity maximum specific uptake rate  
[mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]

$V_{max, I, r}$  : Hairy roots high affinity maximum specific uptake rate  
[mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]

$V_{max, II, r}$  : Hairy roots low affinity maximum specific uptake rate  
[mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]

$V_{max, i, c, r}$  : Maximum phosphate transfer rate from the AM fungus to the hairy root cells [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]

$V_{max, I, r, S}$  : Hairy roots maximum sugars uptake rate [g sugars  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]

$V_{max, S, c}$  : Maximum sugars transfer rate from the hairy root cells to the AM fungus  
[g sugars  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW  $\bullet$  d<sup>-1</sup>]

$X_r$  : Hairy roots mass [g DW]

- $X_{c,e}$  : Extraradical spores amount [# of spores]
- $X_{c,e, DW}$  : Extraradical spores and hyphal network mass [g DW]
- $Y_{P/r}$  : Hairy roots yield coefficient on phosphate [mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $Y_{N/r}$  : Hairy roots yield coefficient on nitrogen [mmol N  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $Y_{S/r}$  : Hairy roots yield coefficient on sugars [g sugars  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $Y_{P/c}$  : AM fungus yield coefficient on phosphate[ mmol Pi  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW ]
- $Y_{N/c}$  : AM fungus yield coefficient on nitrogen [mmol N  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $Y_{S/c}$  : AM fungus yield coefficient on sugars [g sugars  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW]
- $\mu_r$  : Hairy roots specific growth rate [d<sup>-1</sup>]
- $\mu_{r, \max}$  : Hairy roots maximum specific growth rate [d<sup>-1</sup>]



## 4.8 ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to D. Aubry, M. Gaudette, L. Lavoie and Dr R.D. Williams for technical help, to M.J. Santoire and L. Lamboursain for helpful discussions, and to D. Bouchard of the Department of Civil Engineering for the elementary analysis.

## 4.9 REFERENCES

- Ames RN, Reid CPP, Porter LK, Cambardella C** (1983) Hyphal uptake and transport of nitrogen from two  $^{15}\text{N}$ -labelled sources by *Glomus mosseae* arbuscular-vesicular mycorrhizal fungus. *New Phytol* **95** : 381-396
- Bago B, Vierheilig H, Piché Y, Azcon-Aguilar C** (1996) Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture, *New Phytol* **133** : 273-280
- Bécard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD, Pfeffer PE** (1991) Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by in vitro  $^{13}\text{C}$  NMR and HPLC analyses. *New Phytol* **118**: 547-552
- Bécard G, Fortin JA** (1988) Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri-T-DNA transformed roots, *New Phytol*, **108**: 211-218

**Beever RE, Burns DJW** (1980) Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi, in *Advances in Botanical Research*, HW Woolhouse, ed, Vol 8. Academic Press. London, pp 127-219

**Berta G, Fusconi A, Trotta A, Scannerini S** (1990) Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E<sub>3</sub> in the root system of *Allium porrum* L. *New Phytol* **114**: 207-215

**Bieleski RL** (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* **24**: 225-252

**Bieleski RL, Fergusson IB** (1983) Physiology and metabolism of phosphate and its compounds, in *Inorganic plant nutrition: Encyclopedia of plant physiology* (New series). A. Lauchi and R.L. Bieleski Eds. Springer-Verlag. Wien, New-York (U.S.). pp. 422-449

**Bonfante P, Perotto S** (1995) Tansley Review No. 82: Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytol* **130**: 3-21

**Brundrett MC, Piché, Y, Peterson RL** (1984) A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Can J Bot* **62**: 2128-2134

**Buwalda JG, Ross GJS, Stribley DP, Tinker PB** (1982) The development of endomycorrhizal root systems. III. The mathematical representation of the spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in root systems. *New Phytol* **91**: 669-682

**Capaccio LCM, Callow JA** (1982) The enzymes of polyphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytol* **91**: 81-91

**Chabot S, Bécard G, Piché Y** (1992) Life cycle of *Glomus intraradices* in root organ culture. *Mycologia* **84**: 315-321

**Clarkson DT** (1985) Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annu Rev Plant Physiol* **36**: 77-115

**Clarkson DT, Hanson JB** (1980) The mineral nutrition of higher plants. *Ann Rev Physiol* **31**: 239-298

**Clarkson DT, Sanderson J, Scattergood CB** (1978) Influence of phosphate-stress on phosphate absorption and translocation by various parts of the root system of *Hordeum vulgare* L. (Barley). *Planta* **139**: 47-53

**Cox G, Moran KJ, Sanders F, Nockolds C, Tinker PB** (1980) Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. *New Phytol* **84**: 649-659

**Cress WA, Throneberry GO, Lindsey DL** (1979) Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and nonmycorrhizal tomato roots. *Plant Physiol* **64**: 484-487

**Delucia EH, Callaway RM, Thomas EM, Schlesinger WH** (1997) Mechanisms of phosphorus acquisition for Ponderosa pine seedlings under high CO<sub>2</sub> and temperature. *Ann Bot* **79**: 111-120

**Diop TA, Bécard G, Piché Y** (1992) Long-Term in vitro culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of carrot. *Symbiosis* **12**: 249-259

**Doner LW, Bécard G** (1991) Solubilization of gellan gels by chelation of cations. *Biotech Techniques* **5**: 25-28

**Douds DD Jr, Galvez L, Bécard G, Kapulnik Y** (1998) Regulation of arbuscular mycorrhizal developpment by plant host and fungus species in alfalfa. *New Phytol* **138**: 27-35

**Douds DD , Schenck NC** (1990) Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. *New Phytol* **116**: 621-627

**Drew MC, Saker LR, Barber SA, Jenkins W** (1984) Changes in the kinetics of phosphate and potassium absorption in nutrient-deficient barley roots measured by a solution-depletion technique. *Planta* **160**: 490-499

**Duff SMG, Moorhead CGB, Lefebvre DD, Plaxton WC** (1989) Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol* **90**: 1275-1278

**Elias K, Safir R** (1987) Hyphal elongation of *Glomus fasciculatus* in response to root exudates. *Appl Environ Microbiol* **53**: 1928-1933

**Epstein E** (1972) Mineral nutrition of plants. Principles and perspectives. Wiley and Sons, New York

**Fortin JA, St-Arnaud M, Hamel C, Chavarie C, Jolicoeur M** (1996) Aseptic in vitro endomycorrhizal spore mass production. U.S. Patent 5,554,530.

**Gianinazzi S, Dexheimer J, Gianinazzi-Pearson V, Marx C** (1983) Role of the host-arbuscule interface in the VA mycorrhizal symbiosis: ultracytological studies of processes involved in phosphate and carbohydrate exchange. *Plant Soil* **71**: 211-215

**Gianinazzi-Pearson V** (1984) Host-fungus specificity, Recognition and compatibility in mycorrhizae, in *Plant Gene Research: Genes involved in microbe-plant*

interactions. D.S.P. Verma and T.H. Hohn Eds. Springer-Verlag. Wien, New-York (U.S.). pp. 225-253

**Glund K, Nürnberger T, Abel S, Jost W, Preisser J, Komor E** (1990) Intracellular Pi- compartmentation during phosphate starvation-triggered induction of an extracellular ribonuclease in tomato cell culture. *In* Nijkamp HJJ, Van Der Plas LHW, Van Aartrijk J, eds, Current plant science and biotechnology in agriculture: Progress in plant cellular and molecular biology, Vol 9. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 339-342

**Graham JH, Leonard RT, Menge JA** (1981) Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol* **68**: 548-552

**Harrison M.J, Van Buuren M** (1995) A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**: 626-629

**Hetrick BAD, Bloom J** (1980) The influence of host plant on production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia* **79**: 32-36

**Howeler RH, Cadavid LF, Burckhardt E** (1982) Response of cassava to VA mycorrhizal inoculation and phosphorus application in greenhouse and field experiments. *Plant Soil* **69**: 327-339

**Itoh S, Barber SA** (1983) Phosphorus uptake by six plant species as related to root hairs. *Agron J* **75**: 457-461

**Jennings DH** (1994) Translocation in mycelia *In* Wessels-Meinhardt Eds, The mycota I: Growth, differentiation and sexuality. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, pp 163-173

**Johnson NC** (1993) Can fertilisation of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecological Applications* **3**: 749-757

**Jolicœur M, Germette S, Gaudette M, Perrier M, Bécard G** (1998) Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi: a symbiotic physiological marker. *Plant Physiol* **116**: 1279-1288

**Kendrick B** (1985) The fifth kingdom. Mycologue Publication. Waterloo, Canada. 364p.

**Koide RT, Schreiner RP** (1992) Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 557-581

**Lee RB** (1982) Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. *Ann Bot* **50**: 429-449

**Lee RB , Ratcliffe RG** (1983) Phosphorus nutrition and the intracellular distribution of inorganic phosphate in the pea root tips: a quantitative study using  $^{31}\text{P}$ -NMR. *J Exp Bot* **34**: 1222-1244

**Lee RB, Ratcliffe RG, Southon TE** (1990)  $^{31}\text{P}$  NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. *J Exp Bot* **41**: 1063-1078

**Lee RB, Ratcliffe RG** (1993) Subcellular distribution of inorganic phosphate, and levels of nucleoside triphosphate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: measurements with  $^{31}\text{P}$ -NMR. *J Exp Bot* **44**: 587-598

**Lefebvre DD, Clarkson DT** (1984) Compartmental analysis of phosphate in roots of intact barley seedlings. *Can J Bot* **62**: 1076-1080

**Lefebvre DD, Glass ADM** (1982) Regulation of phosphate influx in barley roots: effects of phosphate deprivation and reduction of influx with provision of orthophosphate. *Physiol Plant* **54**: 199-206

**Leigh RA, Pope AJ, Jennings IR, Sanders D** (1992) Kinetics of the vacuolar  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase. The roles of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates, activators, and inhibitors. *Plant Physiol* **100**: 1698-1705



**Liu C, Muchhal US, Uthappa M, Kononowicz AK, Raghothama KG** (1998)

Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* **116**: 91-99

**Livingston DP III, Henson CA** (1998) Apoplastic sugars, fructans, fructan

exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening.

*Plant Physiol* **116**: 403-408

**Macklon AES, Lumsdon DG, Sim A, McHardy WJ** (1996) Phosphate fluxes,

compartmentation and vacuolar speciation in root cortex cells of intact *Agrostis*

*capillaris* seedlings: effect of non-toxic levels of aluminium. *J Expe Bot* **47**: 793-803

**Merryweather J , Fitter A** (1995) Arbuscular mycorrhiza and phosphorus as

controlling factors in the life history of *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex

Rothm. *New Phytol* **129**: 629-636

**Mosse B, Phillips JM** (1971) The influence of phosphate and other nutrients on the

development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture *J Gen Microbiol* **69**: 157-

166

**Nagahashi G, Douds Jr DD.** (1996) Phosphorus amendment inhibits hyphal

branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its

effects on root exudation. *Mycorrhiza* **6**: 403-408

**Nelder JA, Mead R** (1985) A simplex method for function minimization. *Computer J* **7**: 308-313

**Nuutila A.M, Vestberg M, Kauppinen V** (1995) Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch.) with arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Cell Reports* **14**: 505-509

**Pacovsky RS, Fuller G** (1986) Development of two endomycorrhizal symbioses on soybean and comparison with phosphorus fertilization. *Plant Soil* **95**: 361-378

**Pazoutova S, Votruba J, Rehacek Z** (1981) A mathematical model of growth and alkaloid production in the submerged culture of *Claviceps purpurea*. *Biotech Bioeng* **23**: 2837-2849

**Pfeffer PE, Shachar-Hill Y, Bécard G, Rolin D, Douds DD Jr** (1998) Nutrient transport and metabolism in the life cycle of arbuscular mycorrhizae as examined by NMR spectroscopy. In *Radical Biology: advances and perspectives on the function of plant roots*. Flores HE, Lynch JP, Eissenstat D, Eds. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, Vol 18, pp 178-187

**St-Arnaud M, Hamel C, Fortin JA** (1996) Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. *Mycol Res* **100**: 332-338

**Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM** (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* **116**: 447-453

**Schellenbaum L, Müller J, Boller T, Wiemken A** (1998) Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. *New Phytol* **138**: 59-66

**Simon L., Bousquet J, Lévesque R, Lalonde M** (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69.

**Smith SSE** (1980) Mycorrhizas of autotrophic higher plants. *Biol Rev* **55**: 475-510

**Smith SE, Gianinazzi-Pearson V, Koide R, Cairney JWG** (1994) Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant Soil* **159**: 103-113

**Smith SE, Read DJ** (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*, Ed 2. Academic Press, London

**Taya M, Yoyoma A, Kondo O, Kobayashi T, Matsui C** (1989) Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors. *J Chem Eng Japan* **22**: 84-88

**Taylor TN, Remy W, Hass H, Kerp H.** (1995) Fossil arbuscular mycorrhizae from Early Devonian. *Mycologia* **87**: 560-573

**Theodorou ME, Plaxton WC** (1993) Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol* **101**: 339-344

**Thompson JP** (1986) Soilless culture of vesicular-arbuscular mycorrhizae of cereals: effects of nutrient concentration and nitrogen source. *Can J Bot* **64**: 2282-2294

**Thomson BD, Clarkson DT, Brain P** (1990) Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytol* **116**: 647-653

**Thorsteinsson B, Tillberg JE** (1987) Carbohydrate partitioning, photosynthesis and growth in *Lemna gibba* G3. II. Effects of phosphorus limitation. *Physiol Plant* **71**: 271-276

**Toda K, Yabe I** (1979) Mathematical model of cell growth and phosphatase biosynthesis in *Saccharomyces carlsbergensis* under phosphate limitation. *Biotech Bioeng* **21**: 487-502

**Torriani-Gorini A, Yagil E, Silver S** (1994) Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. American Society of Microbiology, Washington, DC

**Waterer DR, Coltman RR** (1988) Phosphorus concentration and application interval influence growth and mycorrhizal infection of tomato and onion transplants. *J Amer Soc Hort Sci* **113**: 704-708.

**Wilson JM** (1984) Comparative development of infection by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* **97**: 413-426

## CHAPITRE V

# PRODUCTION EN BIORÉACTEUR DE PROPAGULES DU CHAMPIGNON ENDOMYCORHIZIEN *G. INTRARADICES* EN CULTURE SYMBIOTIQUE SUR DES RACINES DE CAROTTE TRANSFORMÉES

## 5.1 INTRODUCTION

Ce chapitre présente les travaux ayant porté sur l'optimisation de la production en bioréacteur de propagules du champignon à arbuscules et à vésicules *Glomus intraradices* (Schenck & Smith) cultivé sur des racines transformées de carotte. L'étude a été limitée à ce champignon étant donné son intérêt industriel immédiat.

Les résultats présentés jusqu'ici démontrent que la technologie de culture en mode submergé est incompatible avec l'objectif de maximisation de la production de spores et de vésicules. Au chapitre deux, il a été démontré que la technique de culture dualiste d'un champignon endomycorhizien sur racines transformées de carotte, développée en boîte de Pétri par Bécard et Fortin (1988), peut être transposée en bioréacteur gazo-siphon et peut mener à une production significative de spores avec  $5\,030 \pm 4\,260$  spores par bioréacteur de 1 L (Figures 2.4C). Cependant la production de vésicules a été négligeable avec une colonisation racinaire maintenue autour du

niveau de l'inoculum, soit  $7 \pm 3\%$  de la longueur racinaire contenant au moins une vésicule (section 4.5.2). Un bioprocédé optimal de production de propagules de champignon endomycorhizien assurera une croissance maximisée du champignon sous ses formes extra et intraracinaire.

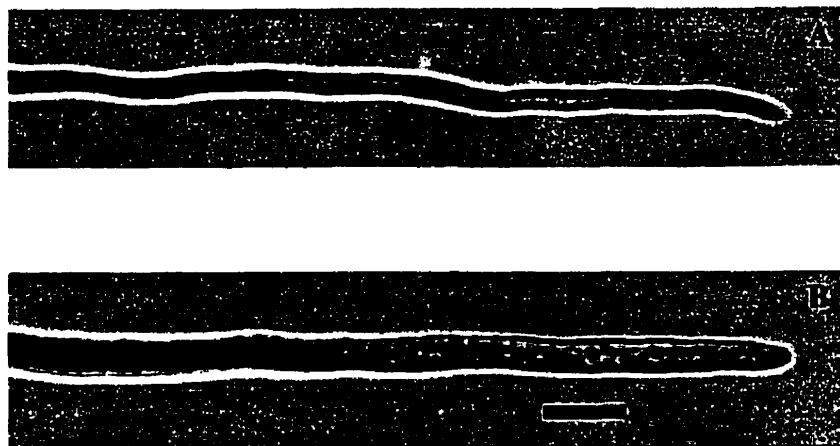
Au Chapitre 4, il a été démontré que la croissance extraracinaire du champignon peut être expliquée par des dynamiques nutritionnelles d'ordre extra et intracellulaire reliées au phosphate inorganique, à l'azote (nitrate ou autres formes) et aux glucides. Ces dynamiques sont évidemment modulées par la quantité de racines mycorhizées en présence et leur taux de consommation des différents nutriments. Cependant, l'ensemble des variations étudiées autour du milieu M en culture submergée n'ont pas permis d'atteindre des productions significatives de vésicules. Ces résultats ont probablement indiqué qu'un mode de culture submergée n'offre pas les conditions favorables permettant au champignon à vésicules et à arbuscules (VAM) *G. intraradices* de se développer à l'intérieur de sa racine-hôte alors que, comme son nom l'indique, ce champignon est connu pour se développer principalement dans les tissus racinaires (Chabot et al., 1992).

En culture submergée, les deux organismes sont continuellement en contact, sur l'ensemble de leur surface, avec l'eau et les éléments du milieu nutritif. Le champignon est soumis aux mêmes limitations nutritionnelles que la racine. Cependant, elles peuvent être perçues après un certain délai par le champignon,

lorsque les concentrations des éléments limitants tombent sous les constantes d'affinité de la racine, si on admet que ces constantes d'affinité chez le champignon sont plus faibles. Le champignon pourrait ainsi continuer à s'alimenter et accélérer sa progression intraracinaire alors que la racine est limitée dans sa croissance. Cependant, cette hypothèse n'a pas été validée en bioréacteur gazo-siphon avec l'utilisation de petits inocula (Chapitre 2). La quantité d'ion phosphate (l'élément limitant), à concentration équivalente, est de 25 fois supérieure à la boîte de Pétri (500 mL en gazo-siphon contre 20 mL de milieu M en boîtes de Pétri). L'inoculation de petites quantités de racines mycorhizées a donc maximisé la quantité en phosphate disponible pour les deux organismes présents. Ces conditions de culture assurant une limitation en concentration et non en quantité disponible n'ont pas permis d'augmenter le nombre de vésicules produites. Il ne s'agit donc pas d'un effet de limitation quantitative. La production massive de vésicules semble donc requérir un facteur supplémentaire à une limitation nutritionnelle commune des symbiotes.

D'autres résultats renforcent cette idée et aident à préciser les actions d'optimisation qui doivent être posées. Tout d'abord, les hyphes se développant dans des systèmes compartimentés (boîte à deux compartiments, bioréacteur à gel-papier) présentent des différences morphologiques et physiologiques. Ces hyphes présentent un diamètre de près du double des hyphes cultivés dans les autres systèmes de culture avec environ  $8,5\ \mu\text{m}$  contre  $4\ \mu\text{m}$  (Figure 5.1). De plus, les apex s'allongent plus de deux fois plus





**Figure 5.1** Apex d'hyphe extraracinaire du champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*. A, Culture symbiotique sur racine de carotte en boîte de Pétri gélifié tel que décrit au Chapitre 4. Diamètre moyen de 4  $\mu\text{m}$ , vitesse de croissance moyenne de 2  $\mu\text{m}/\text{min}$ . B, Culture symbiotique sur racine de carotte inoculée sur une membrane de papier en boîte de Pétri gélifié tel que décrit au Chapitre 4. Diamètre moyen de 8,5  $\mu\text{m}$ , vitesse de croissance moyenne de 4,6  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Observations microscopiques à 63x. Barre = 10  $\mu\text{m}$ .

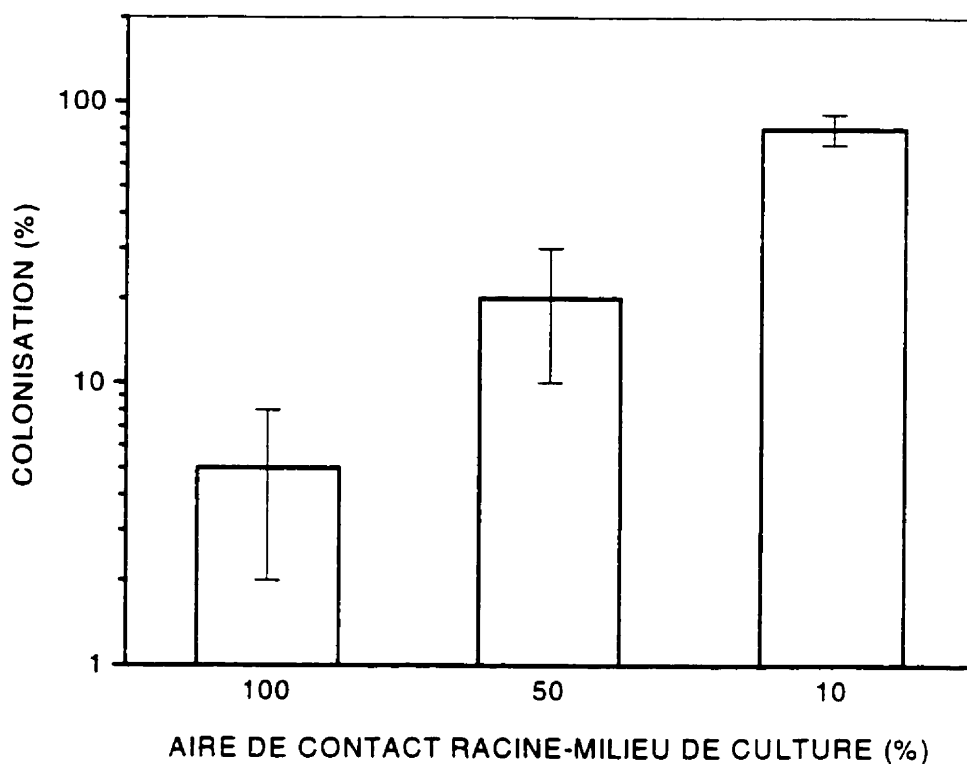
vite avec  $4,6 \mu\text{m} \bullet \text{min}^{-1}$  contre  $2 \mu\text{m} \bullet \text{min}^{-1}$  en systèmes non-compartmentés. Ces données doivent être mises en perspective avec les observations présentées au Chapitre 3 montrant que ces hyphes, cultivés en culture compartimentée, maintiennent un pH cytosolique plus élevé. Ce pH plus élevé provient sans doute d'une augmentation de l'activité des pompes ATPase sortant les protons, activité nécessaire pour assurer le co-transport ( $\text{H}^+$ ) des nutriments. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les hyphes en culture compartimentée ont une activité métabolique plus intense et une consommation accrue en nutriments.

Une des clefs permettant d'optimiser le procédé de production réside dans la compréhension des phénomènes impliqués dans la culture compartimentée. Les résultats obtenus avec les différents procédés de culture ont été comparés pour leur capacité à stimuler la croissance intraracinaire du champignon. Les modes de culture ont été pondérés selon leur capacité à limiter l'alimentation directe de la racine-hôte sans affecter la capacité du champignon à s'alimenter et, possiblement, à imposer un stress osmotique et/ou nutritionnel à la racine. Le critère de pondération a été gradué selon le pourcentage de la surface totale de la racine en contact avec le milieu de culture (ou la membrane de papier). Ce critère s'appuie sur l'hypothèse qu'il existe une concentration maximale en transporteurs transmembranaires par unité de surface de racines : un nombre fini de transporteurs transmembranaires ne pourra alimenter et supporter la croissance que d'un nombre fini de cellules. On parlera alors, de façon

spéculative, d'un critère de dépendance de la racine face aux capacités de translocation du champignon.

Les données ont été regroupées (Figure 5.2) en cultures submergées (100% de contact), sur milieu gélosé incluant les boîtes à un et deux compartiments (contact estimé à environ 50% de la surface racinaire totale) et sur une membrane de papier (contact estimé à environ 10% de la surface racinaire totale). Une relation de premier ordre peut être tracée entre l'aire de contact et le pourcentage de colonisation. Un des scénarios possibles serait que la racine, dont très peu de sa surface est en contact avec le milieu de culture, ressent un stress osmotique et/ou nutritionnel. Il s'en suivrait une croissance moindre et une plus faible résistance envers la colonisation par le champignon. Ce scénario n'est valide que dans le cas d'un stress osmotique et nutritionnel car aux Chapitres 2 et 4 il a été démontré que des racines cultivées en milieu liquide dont la croissance est fortement réduite (faibles  $P_i$  extracellulaire) n'ont pas été plus colonisées que celles cultivées en conditions non-restrictives en  $P_i$ .

Les données présentées ne tiennent pas compte de l'accroissement de la masse racinaire totale qui suit une relation inverse face au niveau de colonisation. Cependant, il s'agit, pour l'instant, de déterminer un des facteurs pouvant expliquer les niveaux élevés (recherchés) de colonisation racinaire observés en système à gel-papier.



**Figure 5.2** Relation entre l'aire de contact des racines mycorhizées avec le milieu nutritif et la colonisation racinaire. La colonisation racinaire correspond au pourcentage d'unités de longueur de racine contenant au moins une vésicule. L'aire de contact de 100% correspond aux cultures en milieu liquide (selon les données des Chapitres 2 et 4), de 50% (estimé) aux cultures sur milieu gélosé (Gaudette, 1997) et de 10% (estimé) aux cultures sur gel-papier (Fortin et al., 1996; Gaudette, 1997). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95% (erreur standard).

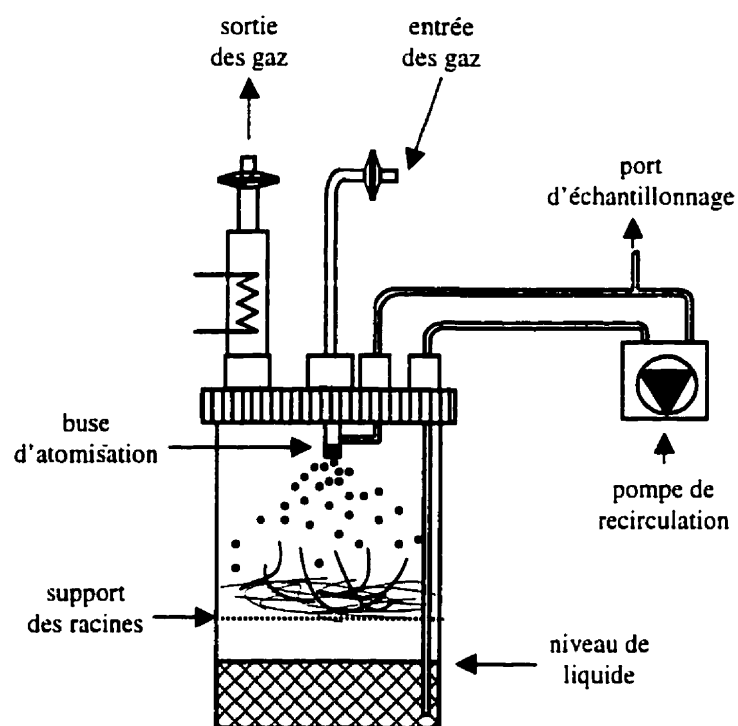
Les travaux d'optimisation de la production de propagules (spores et vésicules) en bioréacteur ont cherchés à imposer un stress osmotique et nutritionnel à la racine. Un nouveau type de bioréacteur a dû être utilisé afin d'être en mesure d'imposer des conditions de culture compartimentée. Pour obtenir les flexibilités d'opération et de conception nécessaires, la configuration de bioréacteur devait répondre à deux critères, soit :

1. permettre les remplacements de milieu de culture sans que le réseau champignon-racine ne soit altéré;
2. limiter l'alimentation directe des racines sans affecter l'approvisionnement du réseau extraracinaire du champignon.

Le bioréacteur alimenté en mode brouillard (Figure 5.3), largement utilisé pour la production de métabolites secondaires à partir de racines transformées (Wilson et al., 1990; Dilorio et al., 1992; Whitney, 1992; McKelvey et al., 1993; Toivonen, 1993; Ramakrishnan et al., 1994), et déjà évalué (Chavarie et al., 1992) a été utilisé. Cette technologie, consistant en une croissance aérienne des racines, supportées sur un grillage et alimentées par une atomisation continue en milieu nutritif en tête du bioréacteur, a été étudiée. La configuration du bioréacteur alimenté en mode brouillard a été modifiée afin d'imposer des conditions de culture compartimentée selon le concept du bioréacteur à gel-papier déjà discuté et étudié (Gaudette, 1997).

Ce chapitre présente dans un premier temps, le comportement des symbiotes lorsque cultivés dans un bioréacteur opéré en mode brouillard. Dans un deuxième temps, des travaux d'optimisation de l'opération du bioréacteur ont été réalisés. Par la suite, une approche de transposition directe du concept du bioréacteur à gel-papier a été appliquée au bioréacteur opéré en mode brouillard optimisé. Une configuration originale comportant une matrice supportant les racines et étant perméable aux hyphes du champignon a été développée et étudiée comme une transposition du système de culture compartimenté. Finalement, la performance de la culture compartimentée en bioréacteur opéré en mode brouillard a été étudiée.

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre vise donc l'optimisation de la productivité en propagules, tant en spores qu'en vésicules, du champignon endomycorhizien *Glomus intraradices*, au moyen d'un procédé en bioréacteur transposable à l'échelle industrielle.



**Figure 5.3** Configuration du bioréacteur opéré en mode brouillard

## 5.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 5.2.1 Le matériel biologique

Ces procédures sont décrites à la section 4.4.1.

### 5.2.2 Les cultures en bioréacteurs

Les cultures en bioréacteurs opérés en mode brouillard ont été réalisées en 3 à 4 réplicats. Des inocula de racines transformées non-mycorhizées et mycorhizées de  $1 \pm 0,2$  g WW ont été utilisés. Tous les milieux ont été stérilisés à l'autoclave durant 35 min à  $121^{\circ}\text{C}$  (1 atm). Les cultures en bioréacteurs se sont déroulées à  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Les bioréacteurs ont été construits à partir de récipients d'un volume total de 1.2 L (11 cm de diamètre intérieur x 13 cm de hauteur) autoclavables en polycarbonate (Nalgene, Sybron International, Rochester, NY, USA) avec un couvercle modifié (Figure 5.3). Les racines ont été supportées par un panier (7 cm de diamètre intérieur et 5 cm de hauteur) fabriqué en un grillage d'acier inoxydable (grade 304) présentant une porosité de 200  $\mu\text{m}$ . Le panier était installé à 5 cm du fond du bioréacteur. L'atomisation du milieu de culture liquide au-dessus des racines a été générée par l'écoulement croisé des alimentations en gaz ( $100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  d'air à 2%  $\text{CO}_2$ ) et en milieu liquide ( $\sim 1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Ce dispositif a permis d'alimenter le lit de racines de façon homogène avec un



taux minimum de renouvellement du liquide de  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$  en périphérie du panier. Le milieu liquide a été mis à recirculer depuis le fond du bioréacteur jusqu'à l'atomiseur. Des filtres à air stériles ("bacterial air vent": Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, É.-U.) et un condenseur ont été utilisés. Toutes les cultures en bioréacteurs ont été effectuées en utilisant un volume de 250 mL de milieu liquide. Les modifications de configuration apportées par l'ajout d'un lit de grains de perlite sont décrites dans la section Résultats et Discussions. Une sonde à oxygène dissous (polarographique : Ingold, Urdorf, Suisse) a été utilisée afin de suivre la concentration en oxygène des gaz de sortie. La sonde a été installée et isolée à l'intérieur d'un corps de seringue de 25 mL rempli de 10 mL d'eau distillée. Les gaz de sortie ont été alimentés au bas de la seringue. Pour l'ensemble des cultures, aucune consommation en oxygène a été mesurée en opération.

### 5.2.3 Analytique

#### 5.2.3.1 Échantillonnage et récolte des systèmes de culture

Ces procédures sont décrites à la section 2.5.1.

#### 5.2.3.2 Évaluation de la croissance intraracinaire du champignon endomycorhizien

Ces procédures sont décrites à la section 4.5.2.

La longueur spécifique pour les racines transformées de carotte utilisées est égale à  $84 \text{ m} \cdot \text{g}^{-1}$  DW de racines (Gaudette, 1997). De 200 à près de 1000 sections de 2 mm

ont été observées pour chacune des cultures correspondant à 0,006 à 0,024 g DW de racines. Lorsque moins d'une section sur 10 sections consécutives contenait au moins un vésicule sur plusieurs racines observées, le reste des racines était entièrement observé rapidement sans effectuer le décompte de vésicules ni leur distribution.

#### *5.2.3.3 Sélection et études d'une matrice-support*

Devant les faibles performances observées en bioréacteurs à favoriser un développement intraracinaire du champignon sous forme de vésicules, une approche de transposition directe du bioréacteur à gel et papier a été appliquée en bioréacteur opéré en mode brouillard. Les travaux ont porté sur la sélection et l'utilisation d'une matrice pouvant supporter les racines mycorhizées, y limitant l'intrusion tout en permettant aux formes extraracinaires du champignon (hyphes et spores) de s'y développer.

Le matériau de la matrice-support a dû respecter les critères suivants:

- 1) biocompatibilité avec les organismes en co-culture;
- 2) demeurer inerte face aux constituants des milieux de culture utilisés;
- 3) résister à une stérilisation à la vapeur;

- 4) présenter un caractère hydrophile et non-restrictif à la diffusion des constituants des milieux de culture par effet capillaire;
- 5) structurellement autoportant lorsque saturé en eau;
- 6) fractionnable afin d'évaluer quantitativement la présence du champignon;
- 7) respecter les lois environnementales face à une utilisation ultérieure aux champs comme vecteur de transport de propagules;
- 8) de forme et de formulation compatibles avec un procédé opéré en mode brouillard;
- 9) présenter une flexibilité d'opération en permettant le remplacement de la composition du milieu de culture en tout temps lors du procédé;
- 10) être transposable à l'échelle industrielle;
- 11) ne pas représenter une augmentation du coût du bioprocédé de production.

L'utilisation d'un milieu gélifié et d'une membrane quelconque a été écartée a priori du processus de sélection ne respectant pas le critère (9) de flexibilité d'opération. Le Tableau 5.1 dresse la liste des matériaux présélectionnés de par leur utilisation

**Tableau 5.1** Matériaux des supports de culture présélectionnés

Matériaux	Avantages	Inconvénients
vermiculite <sup>1</sup> (mica expansé)	haute rétention liquide (4,1 g eau/g) coût	adsorption de 0,2 $\mu\text{mol Pi} / \text{g}$ <sup>4</sup> haute compaction lorsqu'hydraté faible porosité de lit (0,19)
charbon activé <sup>2</sup>		relarguage: 2 mM $\text{Na}^+$ et 0,8 mM $\text{SO}_4^{2-}$ faible porosité de lit (0,06) faible rétention liquide (0,79 g eau/g) coût
argile expansé (hydroton <sup>3</sup> 8-50)	porosité moyenne du lit (0,63)	relarguage: 0,8 mM $\text{Na}^+$ , 0,7 mM $\text{K}^+$ 1 mM $\text{Ca}^{2+}$ ; 0,7 mM $\text{SO}_4^{2-}$ faible rétention liquide (0,24 g eau/g) coût
perlite <sup>1</sup>	porosité moyenne du lit (0,55) haute rétention liquide (4,5 g eau/g) coût	relarguage: 0,49 mM $\text{Na}^+$ adsorption de 0,49 mM $\text{K}^+$ granules broyées: 0,02 mM Al

1. Produit par Les Entreprises Premier CDN Ltée, Rivière-du-Loup, Québec, Canada

2. Produit par Aquarium Pharmaceuticals Inc., Chalfont, PA, États-Unis.

3. Produit par Liapor, Tübingen, Allemagne

Toutes les données de relarguage et d'échanges ioniques proviennent d'essais saturés de 25 g du matériau avec 175 mL de milieu M3P

étendue en horticulture et en agriculture en plus de satisfaire les critères énumérés ci-haut.

Des essais ont été effectués afin de mesurer les propriétés importantes des différents matériaux pour fins de comparaison et d'applicabilité aux cultures en question. Dans l'optique d'une flexibilité d'opération, une rétention liquide élevée est désirée afin d'offrir un effet capillaire adéquat pour alimenter les racines mycorhizées en surface.

Aucun des matériaux testés n'est totalement neutre face au milieu de culture. Le charbon activé, même rincé à l'eau déminéralisé, relargue du sodium et du sulfate dans le milieu de culture. De plus, ce matériau n'offre que très peu d'espace pour la croissance du champignon avec une porosité de 0,06; le taux de transfert d'oxygène pouvant s'en trouver limité. L'hydroton, même rincé à l'eau déminéralisée, relargue aussi du sodium et du sulfate dans le milieu de culture liquide. Dans le cas de la vermiculite, en plus d'une compaction importante en conditions de saturation en eau, ce matériau a capté une quantité non-négligeable de phosphate inorganique du milieu de culture.

Le choix a été porté sur la perlite expansée car ce matériau allie les avantages d'une porosité de lit permettant l'écoulement de liquides et de gaz ainsi que d'une rétention liquide élevée. De plus, il représentait un net avantage au niveau du coût étant produit et commercialisé par Les Entreprises Premier CDN Ltée, le partenaire industriel de ce projet de thèse. Il s'agit d'un composé minéral vitrifié d'origine volcanique expansé

par exposition à des températures d'environ 1 000°C. Des poches de gaz incluses dans la structure de la perlite forment ainsi des pores fermés à l'intérieur des grains ainsi que des pores ouverts sur la surface externe. Il est donc possible que la croissance des hyphes et la formation des spores ne s'effectuent pas en profondeur des particules de perlite expansé.

La perlite est composée principalement d'oxyde de silicium et d'aluminium (Tableau 5.2). Une analyse ionique par absorption atomique de l'eau de trempage de grains de perlite (10 g de perlite broyée mis en solution dans 1 L d'eau déionisée) a mis en relief un phénomène de lixiviation de l'ion aluminium, passant de l'ordre de traces à 0,02 mM Al. De plus, l'échange d'un ion sodium de la perlite pour un ion potassium du milieu de culture jusqu'à l'atteinte de 0,40 mM Na dans un milieu M3P liquide a été détecté (Chavarie et al., 1998).

L'aluminium présente un effet toxique sur les plantes et les champignons qui s'observe généralement par une diminution de la croissance ainsi que de la masse finale. Pour des cellules de carotte, une concentration en aluminium de 0,05 mM a entraîné une diminution de la croissance de 35% (Honda et al., 1996). D'autres plantes sont plus sensibles, tel le blé avec 75 à 100% de diminution de la croissance pour une concentration de seulement 0,01 mM en aluminium et la tomate pour une concentration de 0,025 mM (Simon et al., 1994). Des racines mycorhizées mises en culture dans un milieu M3P liquide fait à partir de cette solution de trempage ont

montré, après seulement quelques jours, des signes apparents de nécrose (brunissement prononcé) et aucun signe de croissance n'a été observé même après trois mois (Chavarie et al., 1998). Cependant, l'utilisation d'un lit de grains de perlite non-broyés n'ayant subi qu'un rapide rinçage à l'eau distillée n'a réduit que de moitié l'accroissement de la masse racinaire sans signe de nécrose (Gaudette, 1997). Il semble donc que l'aluminium demeure stable dans la structure de la perlite mais qu'une quantité peut en être libérée lorsque la structure est brisée.

En ce qui concerne l'effet d'un apport supplémentaire en sodium, il a été démontré que le processus de mycorhization primaire (la 1<sup>ère</sup> colonisation d'une racine) de racines transformées de carotte par le champignon à arbuscules *Gigaspora margarita* est affecté pour une concentration en sodium supérieure à 0,2 mM dans le milieu de culture (Bécard et Fortin, 1988). Le sodium n'est pas toxique à cette concentration et est probablement utilisé par les racines en complément du potassium dans le processus de régulation du potentiel membranaire (Clarkson et Hanson, 1980).

**Tableau 5.2** Composition élémentaire de la perlite

Élément	Lixiviat <sup>1</sup> (mM)	Perlite <sup>2</sup> (% massique)	Littérature (% massique)	
Si	n/d	n/d	33,8	Perlite Institute (1983)
Al	0,02	7	7,2	"
Na	0,46	2,9	3,4	"
K <sup>(3)</sup>	0,051	n/d	3,5	"
H <sub>2</sub> O	n/d	n/d	3	"
Fe (Ca)	< 0,001	0,64	0,6	"
Ca <sup>(3)</sup>	0,026	n/d	n/d	
Mg <sup>(3)</sup>	0,037	n/d	0,2	"
Cu	0,002	< 2 ppm	n/d	
Cr	< 0,001	< 5 ppm	n/d	
Pb	< 0,05	< 5 ppm	n/d	
Ag	< 0,02	< 2 ppm	n/d	

1. Obtenu par trempage de 10 g de perlite broyée mise en solution dans 1 L d'eau déminéralisée jusqu'à saturation (1 semaine).

Le liquide filtré (0,22 µm) et analysé par absorption atomique et (3) par chromatographie ionique (Chavarie et al., 1998)

2. Obtenu par absorption atomique (Chavarie et al., 1998)

Afin de contrer la présence d'une concentration en aluminium inhibitrice de la croissance, la perlite utilisée a été systématiquement lavée de l'aluminium libre par un rinçage en continu à l'eau distillée (24 h). Un traitement supplémentaire visant à réduire le transfert de sodium lors des cultures a aussi été effectué (lorsque spécifié)



par un rinçage dans une solution aqueuse à 5 mM  $\text{KNO}_3$  (25 g  $\bullet$  L<sup>-1</sup> durant 100 h) (Chavarie et al., 1998).

#### 5.2.3.4 Évaluation de la croissance extraracinaire du champignon endomycorhizien

Les procédures de décompte du nombre de spores présentes avec les racines sont décrites à la section 2.5.2.

La quantité de spores incluses dans les grains de perlite a du être estimée vu l'impossibilité d'extraire les spores des grains de façon non-destructive. Le nombre de spores incluses a donc été estimé par le nombre de grains où la croissance d'au moins un hyphe a pu être observée lorsque mis en culture sur un milieu M gélifié (0,4% phytigel) (26°C, 2%  $\text{CO}_2$ , trois semaines à l'obscurité) après avoir été récoltés (suite à un traitement au froid (Nantais, 1997)). Cette technique d'estimation demeure très approximative quant au nombre réel de spores car plusieurs spores peuvent être regroupées dans chacun des grains. Une amélioration significative de l'estimé a été apportée en fractionnant sous asepticité les grains récoltés avant de les mettre en culture. Les grains de perlite ont été fractionnés aseptiquement selon la gamme suivante de diamètre moyen:

1) 0,595 mm;

2) 0,975 mm;

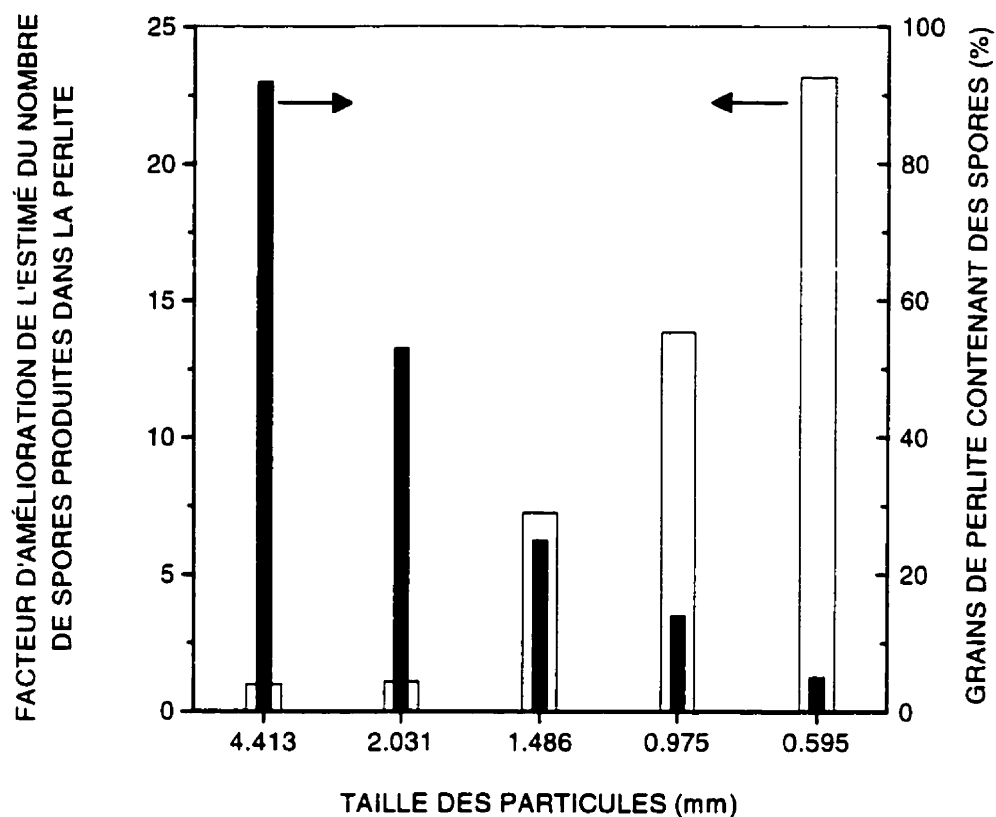
3) 1,486 mm;

4) 2,031 mm;

5) 4,413 mm.

La plus petite fraction étant fixée à 0,595 mm compte tenu de la limite de facilité de manipulation dans une hotte stérile. La figure 5.4 montre le profil typique d'amélioration de l'estimé du nombre de spores dans la perlite par rapport à des grains de perlite non-fractionnés.

La fraction de grains d'où le développement d'au moins un hyphes a été observée passe de 92% pour des grains non-fractionnés à 5% pour la plus petite fraction de 0,595 mm. Cependant, le nombre total de grains avec germination augmente d'un facteur de 23. Il est intéressant de noter que le fractionnement aurait pu être poursuivi étant donné qu'il n'y a pas eu plafonnement du facteur d'amélioration de l'estimé du nombre de spores présentes dans la perlite. Cette technique permet d'améliorer la valeur de l'estimé mais la quantité réelle demeure sous-évaluée de par la présence de spores groupées ainsi que de spores ayant été détruites lors du fractionnement. Toutefois, comme l'objectif premier de ces travaux consistait à maximiser la production de vésicules, la qualité de l'estimé du nombre de spores produites obtenu est considéré comme suffisant.



**Figure 5.4** Effet de la fragmentation des grains de perlite sur l'évaluation de la production de spores. Ordonnée de droite : Pourcentage de grains de perlite où s'est développé au moins un hyphe dans le milieu M gélosé (0,4% phytigel) après trois semaines en boîte de Pétri à la noirceur, à 26°C et 2% CO<sub>2</sub> (barres pleines). Ordonnée de gauche : Facteur d'amélioration de l'estimé du nombre de spores produites dans la perlite suite au fractionnement : (nombre de grains présentant la croissance d'hyphes)/(nombre de grains non-fractionnés présentant la croissance d'hyphes) (barres vides).

La viabilité des spores produites a été évaluée selon les taux de germination. Les suspensions de spores ont été déposées sur un milieu M gélifié (0,4% phytigel) en boîtes de Pétri (plastique, 9 cm de diamètre interne) et mises à germer à la noirceur à 26°C. Après trois semaines, le pourcentage des spores ayant germé a atteint un plateau.

#### *5.2.3.5 Analyse des nutriments extracellulaires*

Ces procédures sont décrites à la section 2.5.3.

## 5.3 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

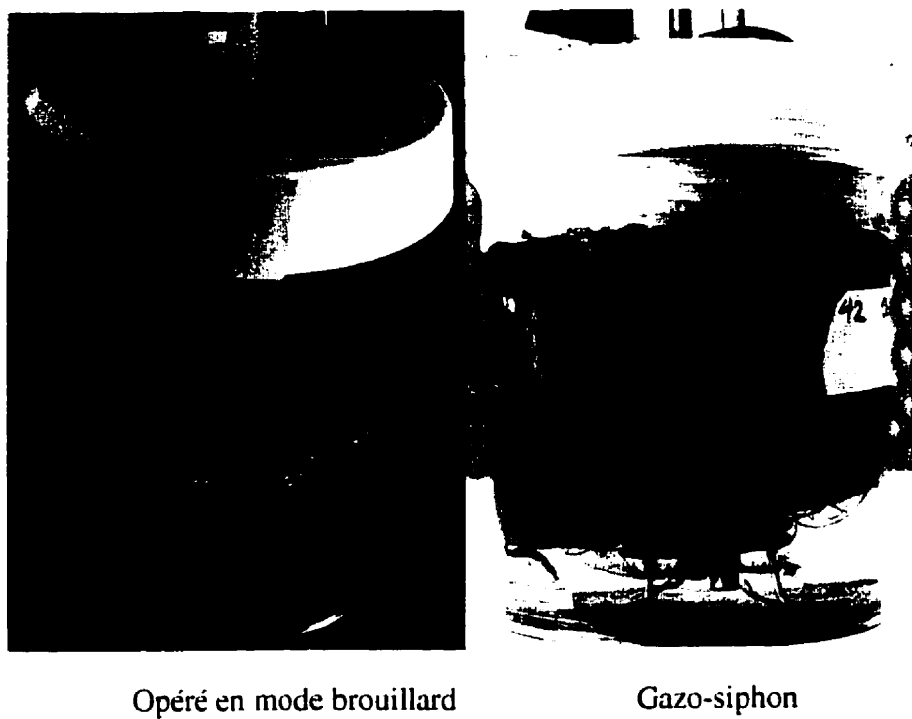
Les résultats présentés dans ce chapitre proviennent, soit d'une culture complète, soit d'une moyenne de plusieurs cultures opérées dans des conditions identiques.

### 5.3.1 Étude du comportement des symbiotes en bioréacteur alimenté en mode brouillard

#### 5.3.1.1 Aspect général des cultures

Des travaux ont d'abord été entrepris afin d'évaluer le comportement des racines de carotte transformées mycorhizées ainsi que du champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* lorsque cultivé dans un bioréacteur alimenté en mode brouillard (Figure 5.5) en comparaison des cultures submergées présentées au Chapitre 2, soit en bioréacteur de type gazo-siphon et en boîte de Pétri.

L'alimentation sous forme atomisée générée par l'alimentation croisée des gaz d'entrée et du milieu M liquide recirculé a permis de maintenir humides l'ensemble des racines en culture (Figure 5.5). Les racines, bien que présentant un géotropisme négatif lorsque transformées par *A. rhizogenes*, se sont développées en un lit compact sous l'effet de la gravité contrairement aux cultures submergées en bioréacteur gazo-siphon pour lesquelles les racines se sont développées vers le haut tel que décrit au Chapitre 2 et illustré à la Figure 5.5.



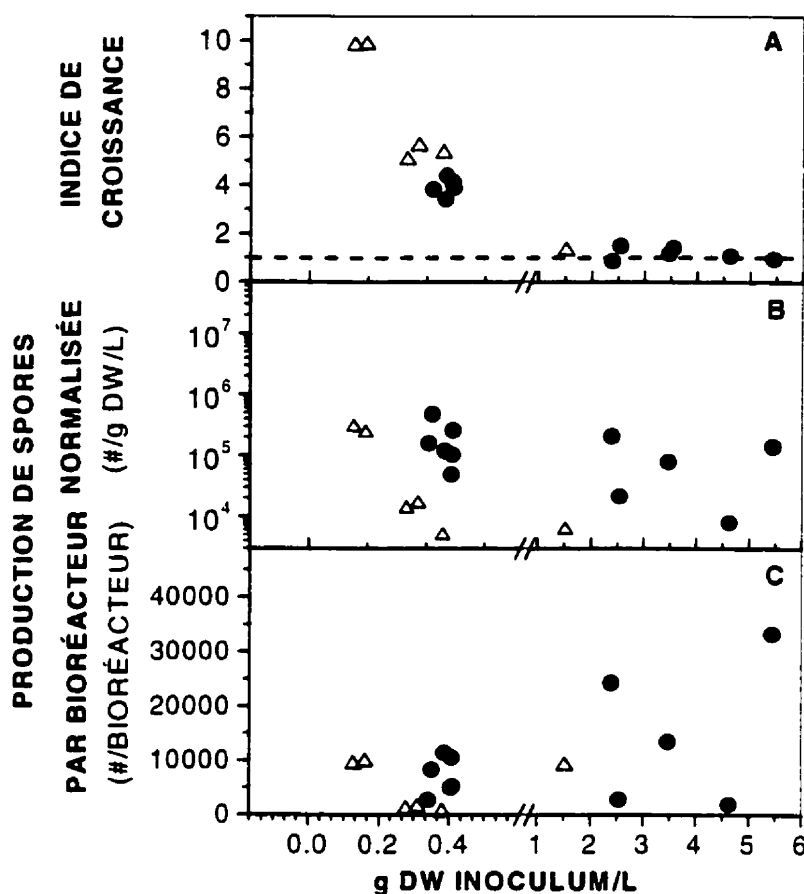
**Figure 5.5** Bioréacteurs brouillard et gazo-siphon en culture

### 5.3.1.2 Étude de l'effet de la quantité d'inoculum sur la performance des cultures

Des essais ont été réalisés afin d'évaluer le comportement des symbiotes selon les conditions d'inoculation en bioréacteur opéré en mode brouillard. L'effet de la quantité de racines mycorhizées inoculées par bioréacteur sur la production de racines et de propagules du champignon (spores et vésicules) a été évaluée. Les conditions optimales quant à la quantité d'inoculum mycorhizé à utiliser doivent permettre l'optimisation du volume utile du bioréacteur, la minimisation du temps de culture requis et la maximisation de la production de propagules du champignon. Les résultats obtenus ont été intégrés aux données présentées au chapitre 2 (Figure 2.4) à la Figure 5.6. La production de vésicules est demeurée négligeable et n'apparaît pas sur la Figure 2.4.

Les résultats de croissance des racines mycorhizées en bioréacteur opéré en mode brouillard se superposent aux résultats obtenus en bioréacteur gazo-siphon avec un seuil critique estimé de  $\sim 0,6 \text{ g DW} \bullet \text{L}^{-1}$  de milieu liquide; la quantité d'inoculum maximale au-delà de laquelle la croissance des racines est significativement réduite sinon nulle (Figure 5.6A).

Sur l'ensemble des conditions d'inoculation, les racines récoltées ne contenaient que très peu de vésicules, dispersées sur la longueur racinaire. Les productions de spores, normalisées (Figure 5.6B) et réelles par bioréacteur (Figure 5.6C), n'ont pas été



**Figure 5.6** Effet de la quantité d'inoculum. A, Indice de l'accroissement de la masse racinaire en g DW de racines mycorhizées récoltées  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW de racines mycorhizées inoculées. B, Production normalisée de spores de *G. intraradices* en spores  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW de racines mycorhizées inoculées  $\bullet$  L<sup>-1</sup> de milieu de culture. C, Production de spores de *G. intraradices* par culture. Cultures en bioréacteur opéré en mode brouillard avec 250 mL de milieu M (●), et en bioréacteur gazo-siphon avec 500 mL de milieu M (Δ).



significativement affectées par la quantité d'inoculum contrairement aux observations en bioréacteur gazo-siphon. Les productions normalisées de spores ont été de  $2,3 \times 10^5 \pm 7,5 \times 10^4$  (SE: intervalle de confiance à 95% de la moyenne) spores  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW inoculum  $\bullet$  L<sup>-1</sup> de milieu avec l'utilisation d'un inoculum inférieur au seuil critique et de  $7,7 \times 10^4 \pm 3,3 \times 10^4$  (SE) spores  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW inoculum  $\bullet$  L<sup>-1</sup> de milieu pour un inoculum au-dessus du seuil. Les productions réelles par bioréacteur ont été de  $13\,700 \pm 6\,050$  (SE) spores par culture pour des inocula supérieurs au seuil critique et  $7\,200 \pm 1\,350$  (SE) spores par culture pour des inocula inférieurs. Les productions normalisées en bioréacteur alimenté en mode brouillard ont été similaires au bioréacteur gazo-siphon alors que les productions réelles par bioréacteur ont été supérieures au bioréacteur gazo-siphon.

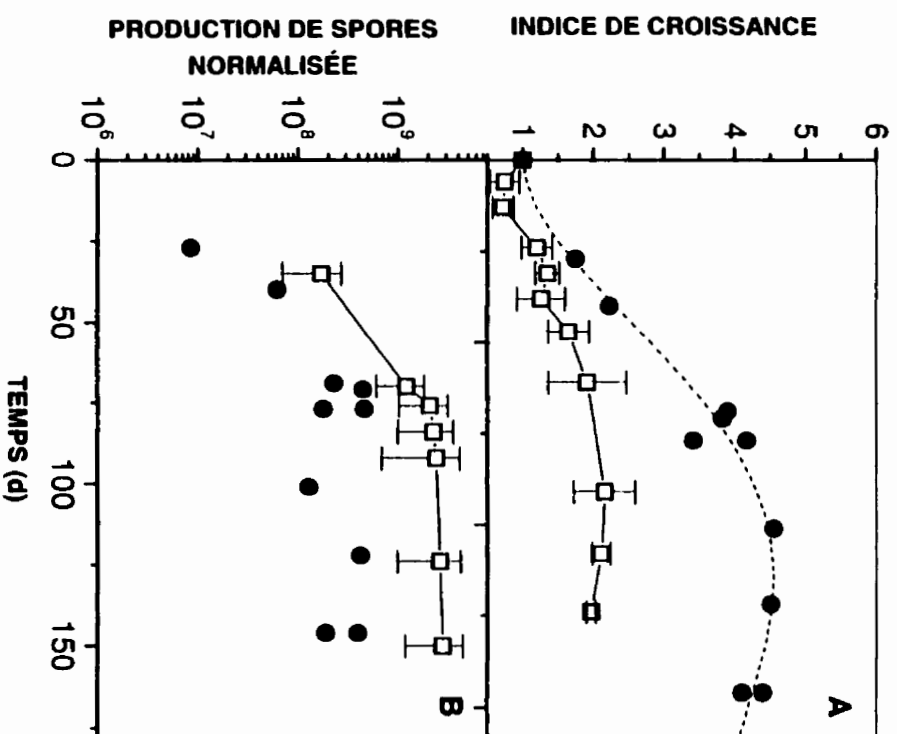
Compte tenu de ces résultats, les cultures subséquentes ont été réalisées avec une unique condition d'inoculation de 0,4 g DW inoculum  $\bullet$  L<sup>-1</sup> (médiane de la plage à bas inoculum). Cette condition permettra de maximiser le volume de bioréacteur dans l'éventualité de l'utilisation de milieux de culture favorisant la croissance racinaire, les lits racinaires occupant moins de 10 % (100 mL) du volume utile du bioréacteur.

#### *5.3.1.3 Comportement biocinétique des symbiotes*

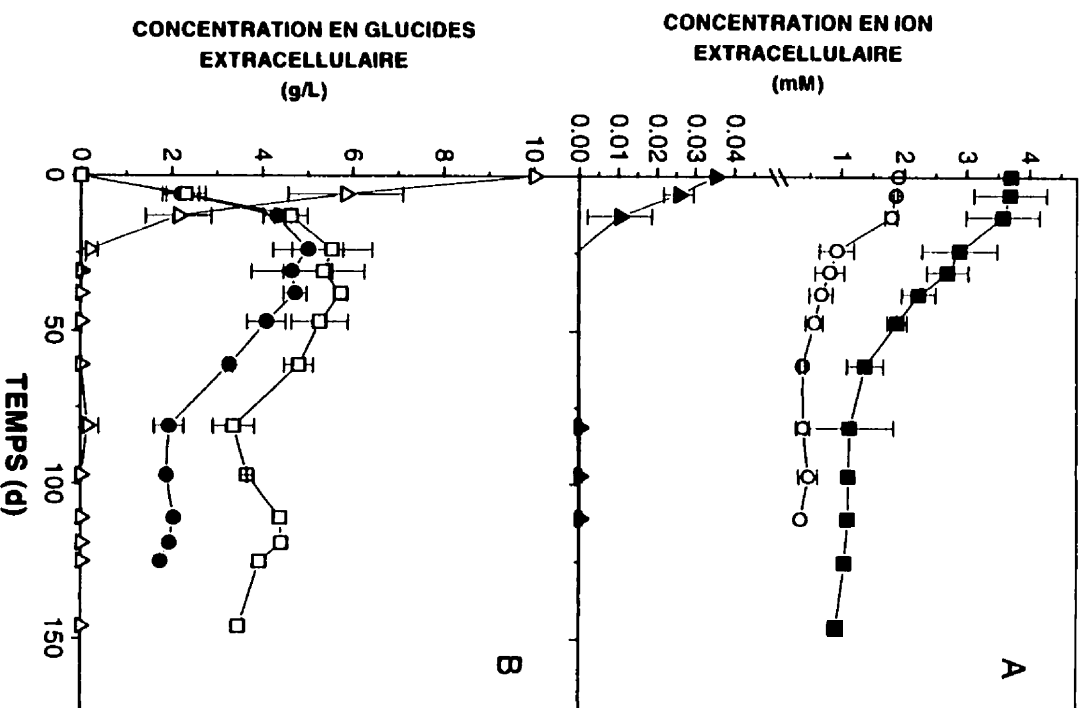
Une culture en bioréacteur alimenté en mode brouillard inoculée à 0,4 g DW  $\bullet$  L<sup>-1</sup> de milieu a été suivie sur l'ensemble de la période de croissance (Figure 5.7A). Les

racines mycorhizées ont démontré un taux spécifique de croissance similaire au taux spécifique de croissance des cultures en milieu M liquide en boîtes de Pétri avec  $0,019 \pm 0,00052$  (SE)  $d^{-1}$  comparativement à  $0,021 \pm 0,0037$  (SE)  $d^{-1}$  en boîtes de Pétri (Tableau 5.3). Cette similitude des taux spécifiques de croissance suggère que les conditions de culture n'ont pas mené à l'établissement de zones mortes ou de courants préférentiels observés pour des cultures à haute densité de racines transformées par Whitney (1992) et Dilorio et al. (1992). L'épaisseur du lit de racines final était de moins de 1 cm et donc inférieur à une épaisseur critique de 18 cm face au transfert en oxygène déterminée par M.J. Boudreau (M.Sc.A. en cours) pour des conditions similaires de culture (Chavarie et al., 1998). La quantité maximale de racines mycorhizées, correspondant à un accroissement de la masse sèche racinaire par un facteur de  $4,48 \pm 0,08$ , a été atteinte après 90 jours de culture comparativement à environ 75 jours pour la culture en boîtes de Pétri (Figure 5.7).

Le phosphate fut le premier élément du milieu de culture à être massivement consommé (moyennant l'erreur expérimentale d'analyse) après moins de 25 jours (Figure 5.8A) comme cela avait été observé pour les cultures en boîtes de Pétri (Chapitre 2, Figure 2.5A). Le rendement en masse racinaire sur le phosphate fut de  $36,8 \text{ g DW} \bullet \text{mmol}^{-1} \text{ Pi}$  (Tableau 5.3), ce qui correspond à la valeur déterminée par analyse élémentaire et présentée au chapitre 4 (Figure 4.5A et Tableau 5.3) pour des



**Figure 5.7** Performances comparées de cultures en bioréacteur brouillard et en boîtes de Pétri en milieu M liquide. A, Suivi de la croissance des racines en g DW de racines mycorhizées récoltées  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW de racines mycorhizées inoculées. Cultures en bioréacteur opéré en mode brouillard avec 250 mL de milieu M et un inoculum de  $1 \pm 0,2$  g WW ( $\bullet$ ), et en boîtes de Pétri avec 20 mL de milieu M et un inoculum de  $0,12 \pm 0,2$  g WW ( $\square$ ). B, Production de spores de *G. intraradices* par culture. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.



**Figure 5.8** Suivi des ions et glucides consommés pour une culture de racines mycorhizées en bioréacteur opéré en mode brouillard en milieu M liquide et un inoculum de  $1 \pm 0,2$  g WW. A. Ions : Pi (▲); K(○); NO<sub>3</sub> (■). B, Glucides : Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

**Tableau 5.3** Données de cultures en bioréacteur opéré en mode brouillard

		<u>Boîtes de Pétri</u>	<u>Bioréacteur brouillard</u>
inoculum	(g DW · L <sup>-1</sup> )	0,6 ± 0,11	0,4 ± 0,11
$\mu_r^{(1)}$	(d <sup>-1</sup> )	0,021 ± 0,0037	0,019 ± 0,00051
Accroissement de la masse racinaire	(g · DW · g DW <sup>-1</sup> )	2,16 ± 0,43	4,48 ± 0,076
Y X/PO <sub>4</sub> <sup>(2)</sup>	(g DW · mmol <sup>-1</sup> )	25,71 ± 3,88	36,80 ± 5,20
Y X/NO <sub>3</sub> <sup>(3)</sup>	(g DW · mmol <sup>-1</sup> )	0,33 ± 0,026	0,60 ± 0,052
Y X/K <sup>(3)</sup>	(g DW · mmol <sup>-1</sup> )	0,64 ± 0,056	1,13 ± 0,086
Y X/S <sub>(glucides)</sub> <sup>(2)</sup>	(g DW · g <sup>-1</sup> sucres)	0,39 ± 0,016	0,19 ± 0,013
$r_{NO_3}^{(1)}$	(d <sup>-1</sup> )	0,024 ± 0,0017	0,028 ± 0,0010
$r_K^{(1)}$	(d <sup>-1</sup> )	0,028 ± 0,0031	0,024 ± 0,0042

1. Taux spécifique maximum calculé pour la période de croissance exponentielle
2. Calculé à partir de la masse sèche totale / phosphate total ou glucides totaux
3. Calculé à partir de la pente: gain en masse sèche / mmol ion consommées

racines cultivées en milieu déficient en phosphate inorganique. L'ion phosphate semble donc avoir été l'élément limitant de la culture comme cela avait été observé en boîtes de Pétri en milieu M liquide (Figure 4.5B).

Les ions nitrate et potassium ne furent pas complètement consommés (Figure 5.8A) et l'arrêt de leur consommation par les racines et le champignon a coïncidé avec l'arrêt de la croissance des racines ainsi que de la production de spores (Figure 5.7B). Les taux spécifiques de consommation des ions nitrate et potassium ont été similaires aux taux observés pour les cultures en boîtes de Pétri en milieu liquide.

Les glucides ont été totalement hydrolysés en moins de 25 jours en glucose et en fructose (Figure 5.8B) et l'arrêt de leur consommation a aussi coïncidé avec l'arrêt de la croissance des racines et de la production des spores. Un rendement en masse racinaire sur les glucides totaux de  $0,19 \text{ g DW} \bullet \text{g}^{-1} \text{ glucides}$  (Tableau 5.3) a été calculé et correspond aux valeurs mesurées pour les cultures en milieux liquides (Chapitre 4).

#### *5.3.1.4 Évolution de la symbiose*

Les racines sont demeurées mycorhizées et la présence intraracinaire du champignon a été observée sur 50 à 75% de la longueur des racines (Tableau 5.4), ce qui représente une augmentation de près de 25% par rapport à l'inoculum utilisé ainsi que par rapport aux résultats obtenus en boîtes de Pétri (de 25 à 50% de la longueur) et en

**Tableau 5.4** Performances comparées en bioréacteurs gazo-siphon et brouillard en milieu M liquide

<u>Systèmes de culture</u>	<b>Production de Spores</b>		<b>Croissance intraracinaire du champignon</b>	
	#/L <sup>2</sup>	% germination <sup>3</sup>	% colonisation <sup>4</sup>	vésicules <sup>5</sup>
Boîtes de Pétri <sup>1</sup>	30 000 ± 11 500	60%	25-50%	7 ± 3%
Bioreacteur gazo-siphon <sup>1</sup>	10 060 ± 3 200	58%	25-75%	< 7 % <sup>6</sup>
Bioreacteur brouillard	28 800 ± 5 400	66%	50-75%	< 7 % <sup>6</sup>

1. Données tirées du Chapitre 2.

2. Production de spores par L de milieu M liquide (n=5).

3. Spores mises à germer sur milieu M gélifié à 0,4% phytigel à la noirceur à 26°C; observations après 3 semaines

4. Pourcentage de la longueur des racines contenant une présence mycélienne (hyphes, vésicules); observations par longueurs de 2 mm.

5. Pourcentage de la longueur des racines contenant au moins une vésicule; observations par longueurs de 2 mm.

6. Observation rapide de l'ensemble des racines

Les erreurs correspondent à l'intervalle de confiance à 95% sur la moyenne.

bioréacteur gazo-siphon (de 25 à 75% de la longueur). Une croissance des racines en lit plus compacte qu'en boîtes de Pétri et surtout qu'en bioréacteur gazo-siphon peut être mise en cause, favorisant ainsi les contacts champignon-racine et donc les possibilités de pénétrations secondaires du champignon dans des segments inexplorés de racines mycorhizées. Cependant, peu de vésicules ont été dénombrées et elles étaient distribuées sur moins de 7% de la longueur racinaire, l'équivalent de l'inoculum.

La production de spores en bioréacteur s'est effectuée à un taux spécifique de  $0,044 \pm 0,017$  (SE) d<sup>-1</sup> ce qui est similaire à la valeur de  $0,035 \pm 0,003$  (SE) d<sup>-1</sup> observée pour les cultures en milieu M liquide en boîtes de Pétri (Chapitre 4, Figure 4.2). Les spores produites ont démontrées une viabilité de plus de 66% (pourcentage de germination), ce qui correspond aux valeurs observées pour les deux types de culture submergée (boîtes de Pétri et bioréacteur gazo-siphon) (Tableau 5.4). Les productions de spores ont été normalisées pour 1 L de milieu liquide pour faciliter la comparaison entre les systèmes étant donné des inocula et volumes de milieu de culture similaires. Ainsi, la production de spores en bioréacteur opéré en mode brouillard a été près de 3 fois supérieure aux productions en bioréacteur gazo-siphon mais similaire aux productions en boîtes de Pétri en milieu M liquide (Tableau 5.4).



### **5.3.2 Optimisation de la configuration du bioréacteur opéré en mode brouillard**

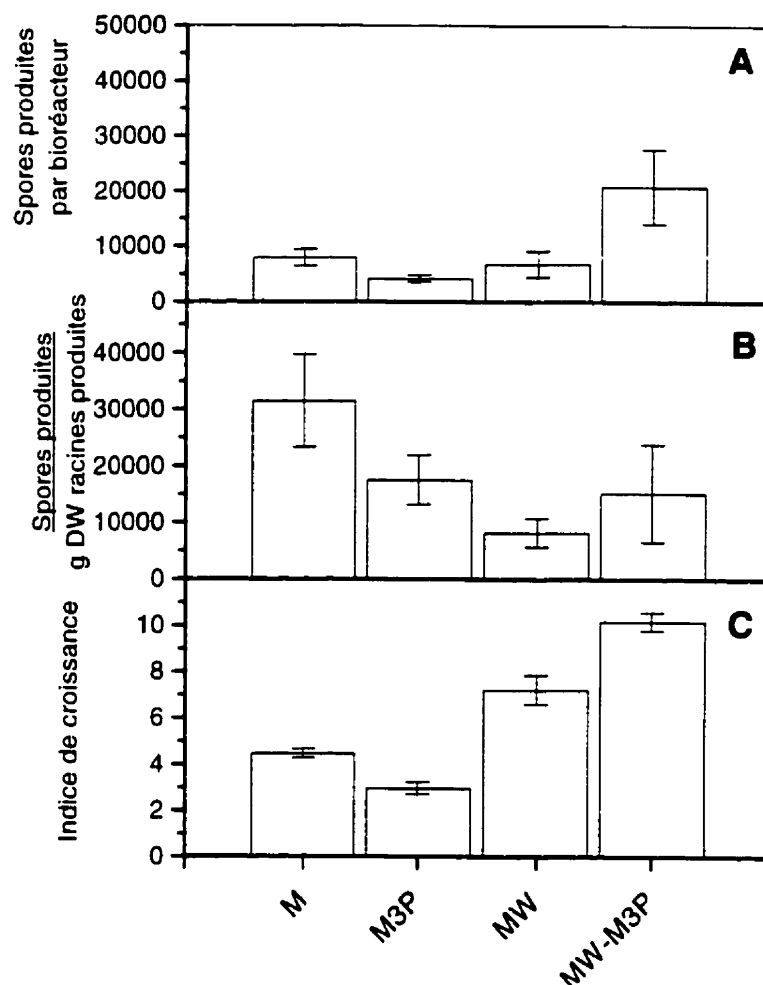
#### *5.3.2.1 Étude visant l'augmentation de la masse racinaire: le lieu de formation des vésicules*

Des travaux en bioréacteur opéré en mode brouillard ont été réalisés avec des milieux enrichis (voir plus bas) par rapport au milieu M avec comme objectif de vérifier l'effet de l'utilisation éventuelle d'un milieu de culture favorisant la croissance des racines sur la croissance du champignon. Un milieu enrichi à 0,12 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (phosphate inorganique :  $\text{Pi}$ ) par un facteur de 3 (M3P) et un milieu majoré par un facteur de 10 en  $\text{Pi}$  et par un facteur de 3 en saccharose (MW2) ont été testés. Ces travaux n'ont pas cherché à optimiser le milieu de culture pour favoriser une croissance maximisée des racines, les milieux B5 ou MS normalement utilisés en culture de cellules végétales auraient alors été exploités (Taya et al., 1989; Nuutila et al., 1995). L'exercice a plutôt cherché à vérifier l'effet sur la croissance du champignon d'une augmentation éventuelle de la concentration en  $\text{Pi}$  et en glucides, deux des nutriments importants pour la symbiose (chapitre 4), afin d'augmenter le taux de croissance des racines en bioréacteur. Le milieu M3P a été sélectionné suite aux résultats du chapitre 4 montrant des taux maximum de croissance des racines et du champignon extraracinaire (Figure 4.2). La majoration en phosphate est nécessaire compte tenu d'une limitation observée pour le milieu M aux chapitres 2 et 4. Le milieu MW2 a été constitué de manière à limiter l'inhibition par le  $\text{Pi}$  extracellulaire ainsi qu'à assurer une quantité en glucides

non-limitante pour la racine compte tenu du taux de consommation du mycelium intraracinaire.

L'enrichissement du milieu a favorisé le développement des racines (Figure 5.9B et C) mais la production maximale de spores a été similaire pour les trois milieux de culture testés (Figure 5.9A). L'utilisation d'une masse racinaire de l'inoculum supérieure pour la culture avec le milieu M3P (1,5x) explique l'atteinte d'un indice de croissance légèrement inférieur à celui observé pour le milieu M. Aucun des milieux de culture n'a favorisé la production de vésicules avec une présence de l'ordre de l'inoculum, soit de moins de 7 % de la longueur racinaire.

L'utilisation d'un milieu enrichi favorise donc la croissance des racines sans réduire le niveau de colonisation des racines (Figure 5.9C). L'ensemble de ces résultats montrent que l'on peut améliorer le procédé de production par une opération en deux étapes distinctes: une première étape visant l'augmentation rapide de la masse racinaire endomycorhizée suivie d'une étape favorisant prioritairement le développement du champignon et le maintien en vie des racines. Une série de cultures ont alors été effectuées selon une utilisation successive des milieux MW2 et M3P afin de simuler un procédé à 2 étapes tel que décrit ci-haut. À partir des résultats obtenus au Chapitre 4 montrant que l'ion nitrate ne semble pas être accumulé par les racines mycorhizées, le milieu de culture MW2 a été changé lorsque l'ion nitrate a été



**Figure 5.9** Performances du bioréacteur opéré en mode brouillard. A, Nombre de spores produites par bioréacteur. B, Nombre de spores produites par masse sèche de racines récoltées. C, Indice d'accroissement de la masse racinaire : g sec récoltés  $\bullet$  g<sup>-1</sup> sec inoculés. Pour des temps de culture de 150 d (M), 90 d (M3P), 130 d (MW2 et MW2-M3P).et des inocula de  $1 \pm 0,2$  g WW par bioréacteur sauf pour M3P avec 1,5 g WW. n=3. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

complètement consommé, soit 44 jours après inoculation afin d'éviter que cet ion devienne limitant à cette étape.

La culture opérée en deux étapes a permis d'atteindre plus du triple des productions de spores observées avec l'utilisation d'un seul des deux milieux de culture testés avec  $20\,800 \pm 6\,700$  (SE) spores par bioréacteur contre une moyenne de  $6\,500 \pm 1\,300$  (SE) spores par bioréacteur (Figure 5.9A). Le procédé opéré en deux étapes a permis d'atteindre le même rendement en spores  $\bullet \text{g}^{-1}$  DW de racines (Figure 5.9B) que celui avec l'utilisation seule du milieu M3P avec  $15\,250 \pm 8\,600$  spores  $\bullet \text{g}^{-1}$  DW de racines produites par rapport à une moyenne de  $8\,200 \pm 2\,500$  spores  $\bullet \text{g}^{-1}$  DW pour l'utilisation unique du milieu MW2. Ce résultat rejoint les conclusions tirées au Chapitre 4 statuant sur l'importance de la dynamique reliée au facteur limitant et possiblement au ratio N:P tel que discuté par Doude et Schenck (1990) pour le même champignon.

L'accroissement de la masse racinaire mycorhizée a été le double par rapport à l'utilisation du milieu M avec un indice de croissance de  $10,19 \pm 0,39$  contre  $4,48 \pm 0,19$  mais similaire à la somme des milieux MW2 et M3P avec  $10,21 \pm 0,89$ . Ces accroissements de la masse racinaire ont mené à des lits compacts de racines de 3 cm de hauteur sur 5 cm de diamètre. Cette épaisseur de lit racinaire est en-deça d'une épaisseur critique de 18 cm face au transfert en oxygène tel que déterminé par M.J.

Boudreau (M.Sc.A. en cours) dans des conditions similaires de culture (Chavarie et al., 1998).

Malgré une amélioration significative des productions respectives de racines mycorhizées et de spores par unité de bioréacteur, la production de vésicules est demeurée négligeable. Les travaux d'optimisation de la production ont été poursuivis à partir d'une opération en deux étapes et se sont concentrés sur l'amélioration de la production de vésicules.

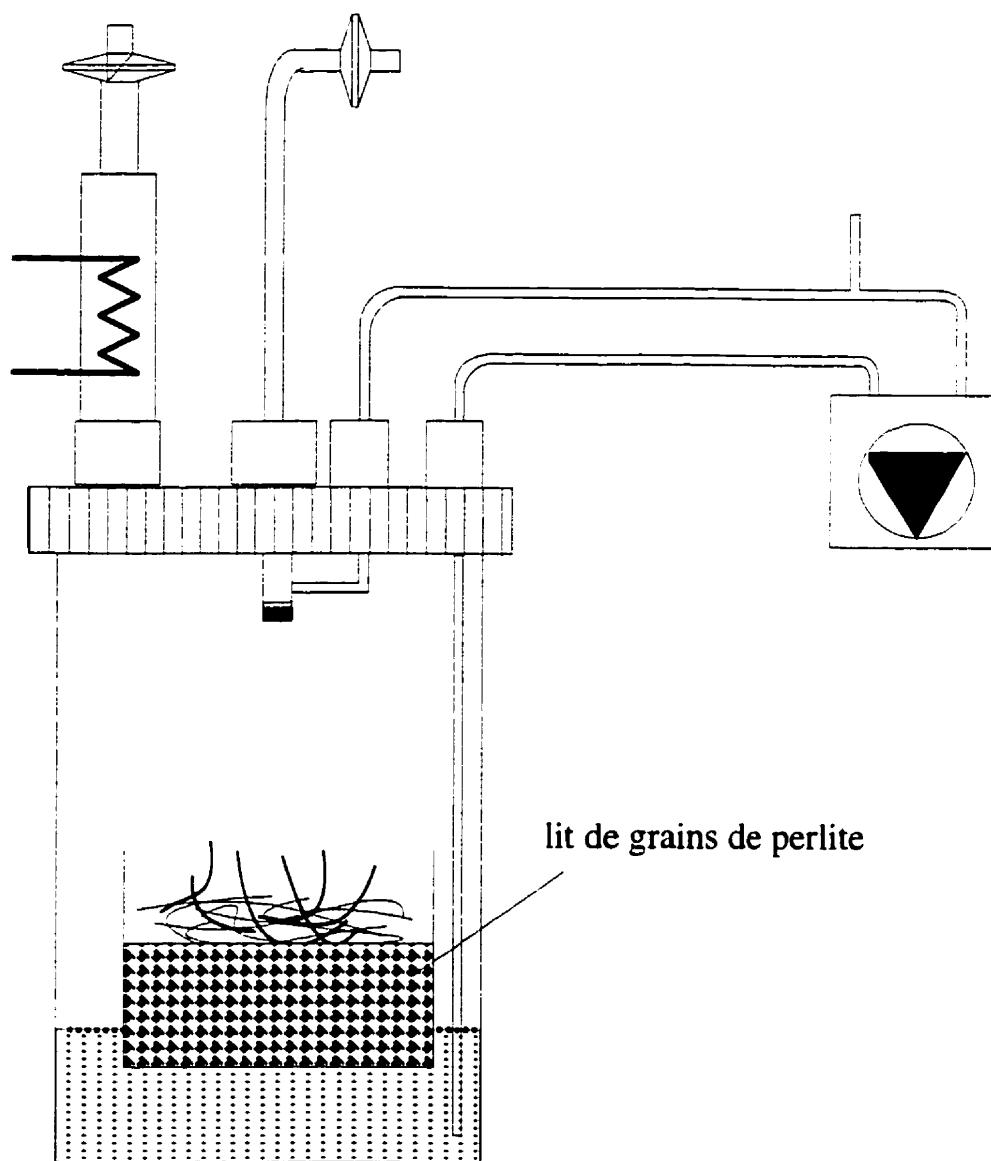
Les différences de comportement en croissance des symbiotes, induites par l'utilisation de milieux de culture différents, se sont aussi traduites par des comportements de consommation des éléments du milieu de culture différents. Pour les milieux M et M3P, seuls le nitrate, le potassium et le phosphate inorganique ont été consommés parmi les ions alors que le magnésium, le chlore et le sulfate ont aussi été consommés pour le milieu MW2. L'apparition de sodium, observé pour l'ensemble des cultures, a été attribuée aux racines étant donné que le milieu M en est exempt et que les racines non-mycorhizées sont sous-cultivées en milieu MW contenant une source de phosphate liée à du sodium. Le sodium est impliqué dans le processus de maintien du potentiel membranaire des cellules végétales, au même titre que le potassium, mais une préférence pour le potassium est généralement observée (Clarkson et Hanson, 1980). Il se peut donc que les cellules des racines échangent le sodium qu'elles contiennent pour du potassium jusqu'à l'épuisement de cet ion du

milieu de culture pour ensuite le re-consommer. La consommation des autres ions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , Mg) peut avoir été reliée à une activité métabolique plus élevée.

### **5.3.3 Étude de la compartimentation des symbiotes en culture en bioréacteur brouillard**

#### *5.3.3.1 Modification de la configuration du bioréacteur*

La configuration du bioréacteur opéré en mode brouillard a été modifiée par l'ajout d'un lit de grains de perlite à même le panier grillagé supportant normalement les racines (Figure 5.10). Un volume de perlite de 185 mL, comportant  $2250 \pm 100$  grains dont le diamètre moyen était de 4,413 à 6 mm et représentant une masse totale de 15 g a été déposé dans le panier. Le lit de perlite présentait une épaisseur d'environ 5 cm permettant d'être immergé dans le milieu nutritif liquide sur 1 cm et de maintenir éloignées les racines de la surface du milieu liquide. Cette configuration permet d'alimenter les racines selon deux modes: 1) en mode brouillard, et 2) par capillarité jusqu'aux surfaces des racines en contact avec les grains de perlite. La partie extraracinaire du champignon a été libre de se développer à l'intérieur de la matrice ayant accès continuellement aux constituants du milieu nutritif.



**Figure 5.10** Configuration du bioréacteur compartimenté opéré en mode brouillard.

### *5.3.3.2 Étude de performance de la culture compartimentée en bioréacteur opéré en mode brouillard*

#### *Évaluation des modes d'opération*

Le potentiel d'un lit de perlite a été évalué en bioréacteur selon son efficacité à favoriser la compartimentation des symbiotes en culture en limitant les racines dans leur pénétration du lit de particules tout en supportant le développement des hyphes extraracinaires et des spores du champignon *G. intraradices*. Les hypothèses posées portant sur une stimulation de la production de vésicules induite par des conditions de dépendance nutritionnelle des racines envers le réseau extraracinaire du champignon ainsi que par un effet osmotique via l'assèchement des racines ont été évaluées. Cependant, les conditions expérimentales imposées (Tableau 5.5) n'ont pas permis d'imposer un seul des deux facteurs à la fois et les effets osmotique et nutritionnel ont donc été fondus. L'essai #1 a constitué la culture témoin opéré en mode brouillard. Deux fractions de grains de perlite ont été utilisées afin d'étudier la possibilité de faire croître le champignon dans des grains qui seront directement utilisés comme inoculant commercial, évitant ainsi de détruire des spores lors du processus de fractionnement.

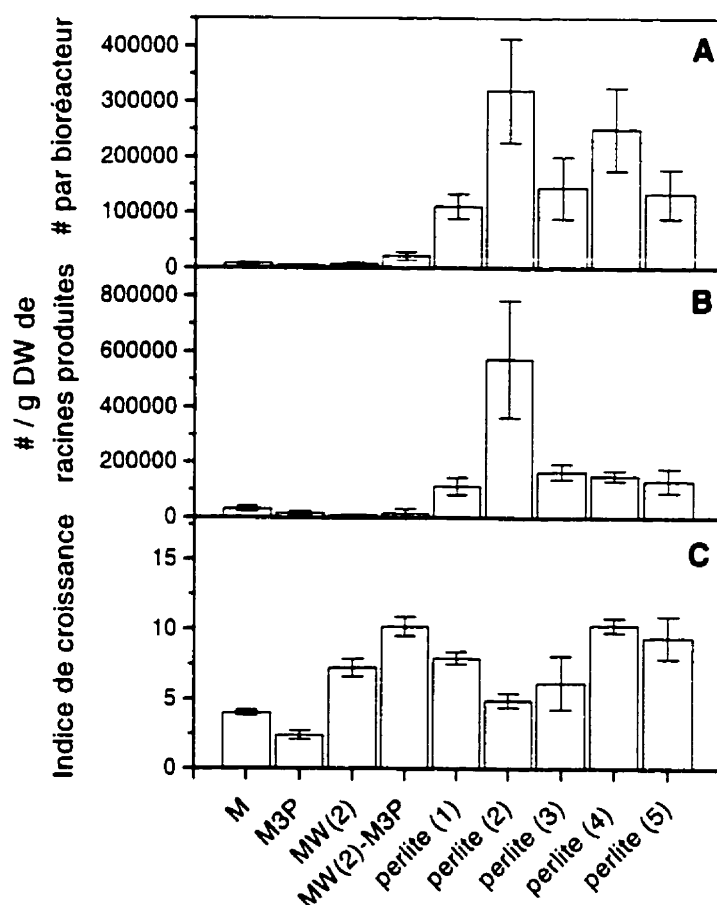


**Tableau 5.5** Essais effectués avec un lit de perlite

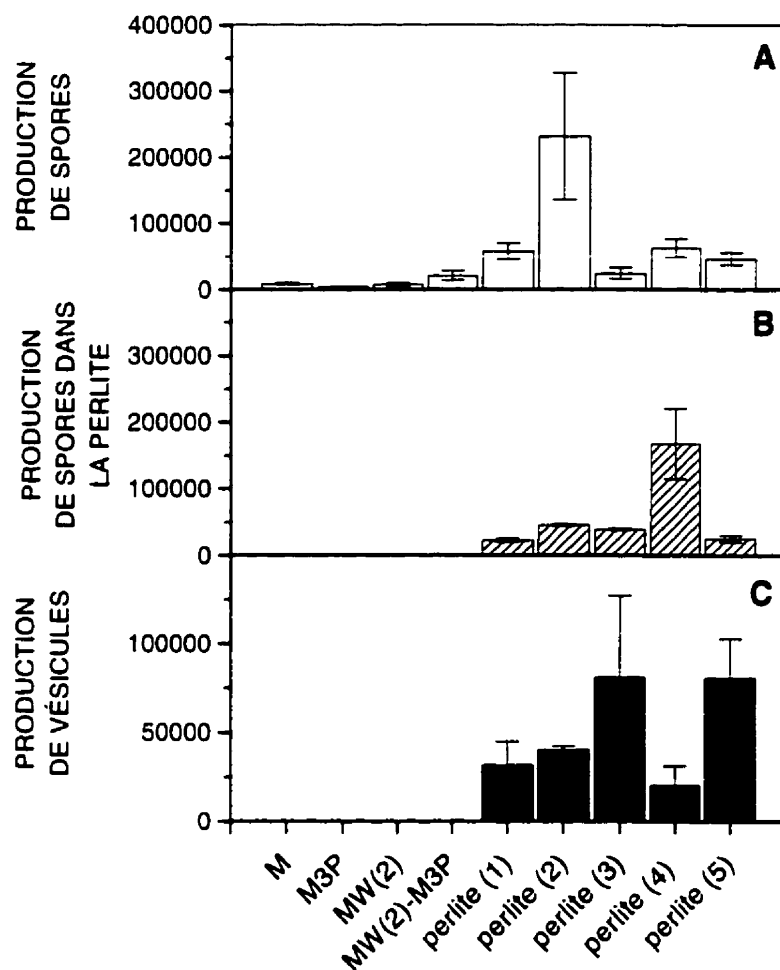
Mode d'opération			Type de perlite	Traitement
#	étape 0	1 <sup>ère</sup> étape	2 <sup>ème</sup> étape	
1		brouillard (57 d)	brouillard (112 d)	Non-fractionnée 4,413 à 6 mm Rinçage à l'eau distillée
2		brouillard (57 d)	Alimentation arrêtée (112 d)	Non-fractionnée 4,413 à 6 mm Rinçage à l'eau distillée
3		brouillard (61 d)	brouillard 130 d)	Fractionnée 0,595 à 1,18 mm Sans rinçage
4		brouillard (48 d)	Alimentation arrêtée (121 d)	Fractionnée 0,595 à 1,18 mm Rinçage dans une solution 5 mM KNO <sub>3</sub>
5	Alimentation arrêtée (59 d)	brouillard (101 d)	Alimentation arrêtée (89 d)	Non-fractionnée 4,413 à 6 mm Rinçage à l'eau distillée

Les temps respectifs de chacune des étapes est indiqué entre parenthèses. Lors des étapes avec arrêt de l'alimentation, le milieu de culture a été enlevé après 24 h de trempage.

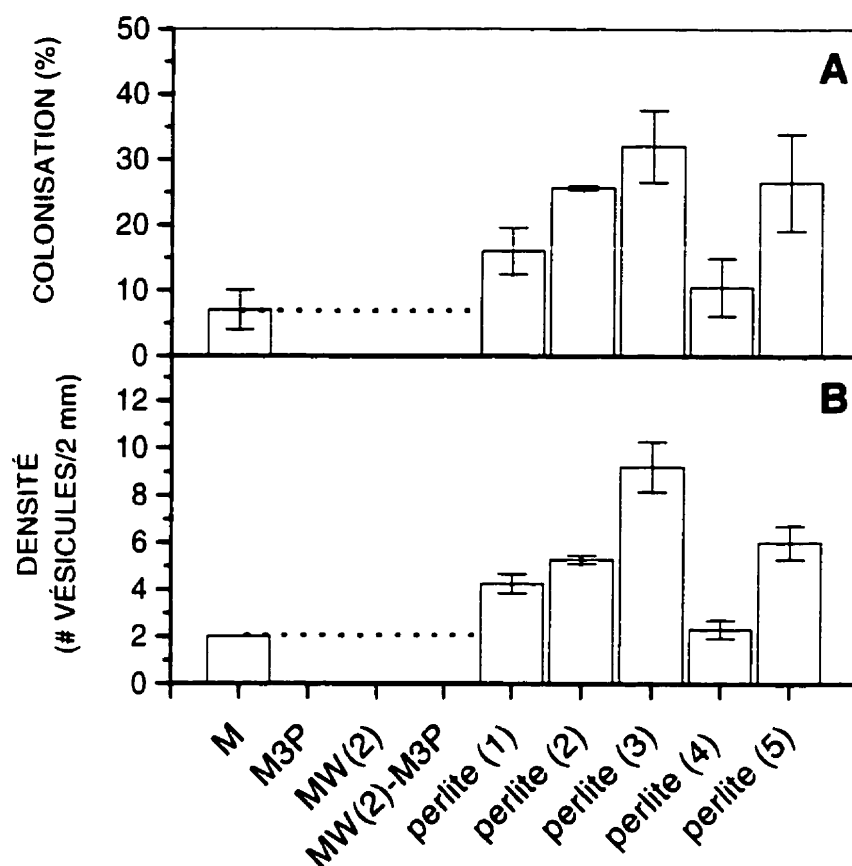
Une opération en deux étapes démarre avec l'utilisation du milieu MW2 suivi du milieu M3P. La première étape a été systématiquement opérée en mode brouillard alors que lors de la deuxième étape, un arrêt de l'alimentation avec le retrait du milieu liquide après 24 h a aussi été testé afin d'appliquer un stress osmotique et nutritionnel sur les racines. Une opération en trois étapes a correspondu à une opération en deux étapes précédée d'une période opérée en mode statique (sans alimentation par atomisation) avec l'utilisation de 250 mL de milieu M3P laissé au fond du bioréacteur. Sans alimentation liquide en tête du bioréacteur, les racines ont été alimentées par le liquide retenu par capillarité sur la perlite ainsi que vraisemblablement par translocation via le champignon s'y développant. L'ensemble des résultats de production sont présentés aux Figures 5.11 à 5.13.



**Figure 5.11** Production de propagules en bioréacteur de 1 L opéré en mode brouillard compartimenté. A, Productions de propagules totales : spores libres + spores dans la perlite + vésicules. B, Rendement en propagules totales : propagules produites / g DW racines produites. C, Indice de croissance des racines : g DW récoltés / g DW inoculés. M, n=3; M3P, n=3; MW2, n=3; MW2-M3P, n=3; Perlite (1), n=4; Perlite (2), n=2; Perlite (3), n=2; Perlite (4), n=4; Perlite (5), n=2. Perlite (#) se réfère au Tableau 5.5. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.



**Figure 5.12** Distribution de la production de propagules en bioréacteur opéré en mode brouillard compartimenté. A, Productions de spores présentes avec les racines mycorhizées. B, Production de grains de perlite contenant au moins une spore. C, Production de vésicules. M, n=3; M3P, n=3; MW2, n=3; MW2-M3P, n=3; Perlite (1), n=4; Perlite (2), n=2; Perlite (3), n=2; Perlite (4), n=4; Perlite (5), n=2. Perlite (#) se réfère au Tableau 5.5. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.



**Figure 5.13** Développement intraracinaire du champignon en bioréacteur opéré en mode brouillard compartimenté. A, Colonisation racinaire : nombre de sections de racines de 2 mm contenant au moins une vésicule sur la longueur racinaire totale. B, Densité de colonisation : nombre moyen de vésicules par section de 2 mm en contenant au moins une. M, n=3; M3P, n=3; MW2, n=3; MW2-M3P, n=3; Perlite (1), n=4; Perlite (2), n=2; Perlite (3), n=2; Perlite (4), n=4; Perlite (5), n=2. Perlite (#) se réfère au Tableau 5.5. Observations sommaires des vésicules (.....). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

### *Croissance des racines*

La pénétration des racines dans le lit de perlite a été confinée à moins de 2 cm de la surface et les racines étaient de la couleur jaune généralement observée pour des cultures sans perlite pour l'ensemble des cultures. Avec une rétention liquide correspondant à 4.5 fois leur poids, le lit de perlite a absorbé environ 70 des 250 mL alimentés au démarrage des bioréacteurs tout en demeurant immergé sur la durée des cultures.

Le comportement nutritionnel des racines mycorhizées cultivées sur un lit de perlite a été similaire au comportement observé sans lit de perlite sauf pour les cultures avec perlite fractionnée non-rincée (#3) et à trois étapes (#5) pour lesquelles aucune consommation significative n'a été observée lors de la première étape des cultures.

L'utilisation de perlite non-rincée au  $\text{KNO}_3$  (toutes sauf #4) a eu pour effet de réduire l'accroissement ultime de la masse racinaire comparativement à une culture en bioréacteur brouillard sans matrice-support de  $10,19 \pm 0,39$  (SE) à  $7,93 \pm 0,45$  (SE) g DW de racines mycorhizées récoltées  $\bullet \text{ g}^{-1}$  DW de racines mycorhizées inoculées (Figure 5.11C). Cette diminution a été plus prononcée pour une culture effectuée avec de la perlite rincée à l'eau distillée avant d'être fractionnée (#3) avec  $6,18 \pm 1,92$  (SE) et une culture utilisant le même lot de perlite non-fractionnée dont les racines ont été

mises en conditions de stress osmotique lors de la deuxième étape (#2) avec  $4,93 \pm 0,52$  (SE).

Par contre, les cultures effectuées avec de la perlite fractionnée et rincée au  $\text{KNO}_3$  (#4) et avec de la perlite non-fractionnée rincée à l'eau distillée en trois étapes (#5) ont menée à des accroissements de la masse sèche racinaire similaires aux cultures opérées en deux étapes sans matrice-support avec  $10,30 \pm 0,51$  (SE) et  $9,42 \pm 0,53$  (SE) respectivement. Sauf pour l'essai #4 dont les racines récoltées présentaient des signes apparents d'assèchement avec un ratio (poids humide)/(poids sec) de  $6,13 \pm 0,63$  g WW  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW, tous les autres essais ont produites des racines présentant un taux d'humidité similaire à la culture témoin (#1) avec  $11,85 \pm 1,33$  (SE) g WW  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW. Les conditions d'assèchement n'ont donc pas eu d'effets répétés sur le contenu en eau des racines. Le débit de gaz utilisé (100 mL $\bullet$ min<sup>-1</sup> d'air à 2% CO<sub>2</sub>) ainsi que l'utilisation d'un condenseur des gaz de sortie n'ont pas imposé des conditions suffisantes à un assèchement rapide des racines. De plus, les grains de perlite sont demeurés saturés en milieu liquide pour tous les essais avec un ratio (masse humide) / (masse sèche) de  $5,42 \pm 0,40$  (SE) g WW  $\bullet$  g<sup>-1</sup> DW.

Les productions inférieures de racines par rapport aux cultures sans lit de perlite peuvent être reliées à la présence de substances inhibitrices de croissance retrouvées dans la perlite non-rincée dont l'ion aluminium est le principal élément tel que discuté à la section précédente. Toutefois, contrairement aux cultures effectuées avec de la

perlite broyée, les racines inoculées sur les lits de perlite fragmentée à 0,595 mm non-rincée à l'eau distillée (#3) n'ont été affectées qu'au cours de la première étape de culture. Lors de cette étape, aucune consommation en éléments nutritifs du milieu de culture n'a été détectée et les racines ne présentaient pas de nouvelles pousses blanches comme il est normalement observé après seulement quelques jours de culture. Les racines sont demeurées vivantes et leur croissance a été initiée à la suite du Remplacement de milieu de culture, ce qui a probablement permis de diluer l'agent inhibiteur.

L'inhibition de la croissance des symbiotes n'est donc pas permanent et peut être levée par le rinçage du lit de perlite, soit en cours de culture ou, préférablement, dans sa forme finale une fois fragmenté avant le démarrage des cultures.

### *Production de spores*

Les productions de propagules ont été significativement augmentées par rapport aux cultures sans matrice-support et ce, pour l'ensemble des cultures avec un lit de perlite. La production de spores a été augmentée par un facteur de 3,4 pour trois conditions de cultures différentes, soit : 1) sur un lit de perlite non-fractionnée et rincée à l'eau distillée (#1) avec  $79\,900 \pm 14\,300$  (SE) spores par bioréacteur; 2) sur un lit de perlite fractionnée et non-rincée (#3) avec  $63\,100 \pm 9\,900$  (SE) spores et; 3) pour la culture opérée en trois étapes (#5) avec  $71\,000 \pm 13\,300$  (SE) spores (non-fractionnée et



rincée à l'eau distillée). La production de spores a été encore plus stimulée pour les deux cultures avec un stress osmotique et nutritionnel imposé lors de la deuxième étape de culture (M3P) avec plus de 12,7 fois la production de spores observée en bioréacteur sans matrice-support. Des productions de  $277\,100 \pm 97\,300$  (SE) et  $230\,000 \pm 66\,100$  (SE) spores ont été obtenues respectivement pour les cultures avec perlite rincée non-fractionnée (#2) et fractionnée et rincée au  $\text{KNO}_3$  (#4). Un rinçage au  $\text{KNO}_3$  (#4) a surtout permis d'augmenter significativement la présence du champignon dans la matrice-support avec  $167\,400 \pm 52\,450$  (SE) grains indiquant la présence d'au moins une spore. Cette production a représenté plus de 70% du total des spores produites. La proportion de spores formées dans le lit de perlite est de 30% pour les autres cultures sauf pour la culture avec perlite fractionnée et non-rincée (#3) avec 60%. L'ion nitrate dans la perlite étant disponible au champignon peut avoir stimulé sa croissance, d'autant plus que les racines se trouvaient en conditions nutritionnelles limitantes, et donc de possible dépendance face au champignon. L'importance d'une possible translocation d'une source d'azote dans la dynamique symbiotique (Ames et al., 1983; Pfeffer et al., 1998), tel que discuté au Chapitre 4, peut être mise en cause étant donné le contenu élevé en nitrate de la perlite laissé par le rinçage au  $\text{KNO}_3$ .

La première étape de culture, opérée en mode brouillard avec un milieu (MW2) favorisant la croissance des racines, conservant toutefois la mycorhize, ne favorise pas le développement extraracinaire du champignon (Figure 5.12). Or, lors du passage à

la deuxième étape avec des conditions osmotiques et/ou nutritionnelles devant favoriser le développement intraracinaire du champignon, la production de vésicules n'a pas atteint les valeurs escomptées. Le champignon (vésicules) était bien dispersé dans les racines à la récolte avec des valeurs de colonisation de  $18 \pm 7,57$  (SE) % (Figure 5.13A). Cependant, la densité en vésicules est demeurée faible avec  $4 \pm 2$  vésicules par section de 2 mm. Lors des cultures en bioréacteur à gel-papier, le développement du champignon est d'abord massivement extraracinaire, puis, intraracinaire (Gaudette, 1997). La production de vésicules et de spores requiert une quantité importante de nutriments (voir les coefficients de rendement présentés au Chapitre 4). Il est alors probable que la production de vésicules nécessite une présence mycélienne extraracinaire au préalable pour puiser les éléments nutritifs requis. Il est aussi possible que le développement du champignon *Glomus intraradices* doive suivre un cycle passant nécessairement par une production de spores, puis de vésicules.

#### *Production de vésicules*

Les productions maximales en vésicules ont été obtenues pour la culture avec de la perlite fractionnée non-rincée (#3) et pour la culture comportant trois étapes (#5) avec  $81\,300 \pm 45\,750$  (SE) et  $80\,900 \pm 21\,900$  (SE) vésicules respectivement. Ces productions élevées ne proviennent pas d'une colonisation plus étendue de la racine mais d'une densité de colonisation plus élevée (Figure 5.13A). Pour ces deux

cultures, la part des vésicules dans le décompte des propagules totales du champignon est de plus de 53% comparativement à 22% pour l'ensemble des autres cultures. Ces deux cultures ont en commun d'avoir imposé un ralentissement de la croissance racinaire lors de la première étape de culture. Dans le cas de la perlite fractionnée non-rincée (#3), la présence d'une concentration trop élevée en aluminium (probablement) a inhibé la croissance des racines durant les deux premiers mois de la culture, jusqu'au remplacement de milieu à partir duquel la croissance des racines a été observée. Dans le cas de la culture #5 en trois étapes, un ralentissement de la croissance des racines a aussi été observé lors de la première étape sans alimentation. Pour ces deux cultures, la consommation en nutriments fut nulle (#3) ou faible (#5). Cependant, il nous est impossible de savoir si le développement intraracinaire du champignon s'est produit lors du ralentissement de la croissance ou subséquemment. Une racine affaiblie est peut-être colonisée plus rapidement, ses réactions de défense étant amoindries.

Poursuivant l'argumentation développée relativement aux prérequis à une production de vésicules, les résultats présentés ici corroborent les hypothèses posées. Pour ces conditions de culture ayant limité la croissance des racines, le champignon a pu étendre, dans un premier temps son réseau d'hyphes dans la matrice-support. Les racines étant vivantes, montrant même des signes d'hydrolyse du saccharose du milieu de culture, les glucides nécessaires à la croissance du champignon lui étaient disponibles. Puis, avec l'imposition de conditions favorables à la croissance des

racines par Remplacement de milieux, le réseau du champignon se maintient en attente tel que proposé au Chapitre 4. Au retour de conditions nutritionnelles limitantes, la croissance des racines est ralentie à nouveau et le champignon possède alors le réseau nécessaire à la consommation des éléments du milieu de culture (sur la perlite) nécessaires à la production de vésicules.

### *Rendement en propagules*

Un indice de la capacité des conditions de culture à favoriser le développement du champignon par rapport à la racine-hôte a été défini comme le ratio de la quantité de propagules produites par g DW de racines produites. Les cultures avec perlite non-fractionnée et rincée (#2) ont permis d'atteindre le plus haut rendement en propagules totales (spores libres + spores-perlite + vésicules) avec  $572\,700 \pm 210\,700$  (SE) propagules  $\bullet g^{-1}$  DW de racines récoltées ou 0,11 g DW de spores (et son réseau) par g DW de racines (calculs basés sur  $1,917 \times 10^{-7}$  g DW par spore et son réseau mycélien associé tel que décrit au Chapitre 4). Toutes les autres cultures avec perlite ont mené à un rendement moyen de  $140\,800 \pm 22\,900$  (SE) propagules  $\bullet g^{-1}$  DW de racines récoltées ou 0,03 g DW de spores par g DW de racines. Ce rendement en propagules par g DW de racines récoltées demeure, cependant, deux fois moins élevé que celui obtenu en bioréacteur gel-papier qui atteint environ 1 000 000 de propagules  $\bullet g^{-1}$  DW de racines récoltées représentant près de 44% du poids des racines récoltées (valeurs calculées à partir des résultats de Gaudette, 1997). Toutefois, le rendement supérieur

global du bioréacteur à gel-papier tient à une colonisation racinaire (vésicules) de près de 80% avec une densité de 11 vésicules par 2 mm de racine contre 26% et 5 vésicules par 2 mm de racine pour la série de culture #2. Cependant, le nombre de spores en bioréacteur opéré en mode brouillard fut plus important qu'en bioréacteur gel-papier avec  $277\,100 \pm 97\,300$  (SE) spores pour des cultures avec perlite non-fractionnée rincée à l'eau distillée (#2) avec alimentation arrêtée à la deuxième étape contre 110 000 spores en bioréacteur gel-papier (Gaudette, 1997). La production de propagules totales obtenue en bioréacteur opéré en mode brouillard a été de  $319\,400 \pm 94\,000$  (SE) propagules contre 589 900 propagules pour le bioréacteur à gel-papier (Gaudette, 1997) pour les mêmes quantités de racines mycorhizées inoculées (0,12 g DW) et le même volume de milieu de culture.

## 5.4 CONCLUSION

***Le développement extraracinaire du champignon : une priorité; le développement intraracinaire du champignon : une finalité***

Les résultats obtenus sont en accord avec les observations en bioréacteur à gel-papier (Gaudette, 1997): il semble que le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* doive réaliser sa croissance extraracinaire avant d'être en mesure de réaliser sa croissance intraracinaire. Il est probable que le réseau extraracinaire atteint

pourra alimenter une production subséquente de vésicules en proportion de son développement (voire ses capacité de consommation). Il est aussi possible qu'il s'agisse d'un cycle de développement relié à une déterminante d'ordre génétique. Le champignon *G. intraradices* produit ses spores indépendamment du niveau de colonisation racinaire (Douds and Schenck, 1990).

L'imposition de conditions de stress osmotique et/ou nutritionnel a favorisé la production de spores étant donné que le développement extraracinaire du champignon n'avait pas été favorisé lors de la première étape de culture.

L'hypothèse reliant l'imposition d'un stress osmotique et/ou nutritionnel sur les racines à la stimulation de la production de vésicules est donc conditionnelle au respect du cycle de développement du champignon.

L'objectif visant l'identification des facteurs clefs impliqués en bioréacteur à gel-papier a donc été partiellement rencontré étant donné l'impossibilité à séparer le stress osmotique du nutritionnel avec la configuration de bioréacteur développée, le choix de la configuration ayant été conditionné par un critère de transposition à l'échelle industrielle.

***Vers un bioprocédé de production de propagules performant***

La configuration du bioréacteur opéré en mode brouillard a démontré une grande flexibilité d'opération et de conception. L'ajout d'un lit de perlite a permis de transposer le concept ainsi que les niveaux de productivités en propagules de la culture compartimentée. De plus, les spores formées dans les gains de perlite sont protégées, peut-être au même titre que les vésicules dans les tissus des racines (Strullu et Plenchette, 1991). Les niveaux de production de spores ont été augmentés par un facteur de 50, passant d'environ 5 000 spores par culture en bioréacteur gazo-siphon à près de 280 000 spores par bioréacteur opéré en mode brouillard munis d'un lit de perlite. La production de vésicules, pour sa part, est passée de quelques centaines (gazo-siphon) à plus de 80 000 par culture. L'objectif d'optimisation de la production de propagules (spores et vésicules) en bioréacteur a donc été atteint.

Les facteurs déterminant de la maximisation de la productivité en propagules sont :

1. La perlite doit être lavée avant utilisation en culture pour éliminer ses contaminants inhibiteurs de la croissance racinaire;
2. La première étape de culture doit limiter le développement des racines afin de maximiser la production de spores;

3. Une étape intermédiaire avec un milieu favorisant la croissance des racines afin de bâtir le volume de production des vésicules doit être imposée;
4. Enfin, une dernière étape limitant le développement des racines mais induisant des conditions favorables au développement intraracinaire du champignon doit être ajoutée.

La voie est maintenant ouverte pour le développement d'un procédé de production industriel de propagules de champignons endomycorhiziens en bioréacteur. Des travaux sont cependant nécessaires afin d'amener le niveau de production de vésicules le long des racines aux valeurs obtenues en bioréacteur à gel-papier.



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces travaux de doctorat proposait de caractériser le comportement des symbiotes champignons endomycorhiziens / racines transformées par des études conciliées de leur physiologie et de leur nutrition en vue d'optimiser la productivité en propagules de champignons en bioréacteur en termes de la quantité et de la qualité. Quatre sous-objectifs ont été poursuivis afin de mettre en place les outils permettant d'améliorer la compréhension des processus impliqués dans la croissance du champignon endomycorhizien en culture symbiotique et de déterminer les paramètres clefs induisant et stimulant ces processus.

- *Démontrer la faisabilité de la production de propagules du champignon endomycorhizien à arbuscules et à vésicules Glomus intraradices en bioréacteur par une culture dualiste sur racines de carotte (Daucus carota) transformées.*
- *Relier les phénomènes macroscopiques croissance et formation de propagules du champignon à des états physiologiques observables découlant de stimulations imposées.*

- *Développer les modèles macroscopiques biocinétiques de comportement décrivant la croissance du champignon et des racines et la production de propagules de champignons.*
- *Poser les bases d'un bioprocédé maximisant la productivité en termes de la qualité et de la quantité de propagules de champignons sous les formes spores et vésicules.*

Les travaux en bioréacteurs ont été initiés par l'étude d'une configuration gazo-siphon présentée dans la littérature pour la culture en milieu liquide de racines transformées. Ce bioréacteur a été évalué pour la culture dualiste de racines transformées mycorhizées en milieu minimal (M) liquide. Il a été observé que les conditions de culture submergées en bioréacteur gazo-siphon permettent de maintenir l'état de mycorhization des racines tout au long des cultures avec un niveau de colonisation de 25 à 75 % (présence mycélienne) à la récolte après 3 à 4 mois de culture. Ce niveau de colonisation n'a pas dépassé le niveau de l'inoculum et la production de vésicules est demeurée négligeable. Les productions moyennes de spores, lorsque normalisées, ont été dix fois inférieures aux productions en boîte de Pétri. Les spores produites ont démontrées un pourcentage de germination élevé de 58 % comparable à la culture témoin en boîte de Pétri.

L'utilisation d'un milieu minimal (M) a entraîné une diminution du taux de croissance des racines. Les racines mycorhizées d'une culture témoin en boîte de Pétri ont présenté un taux spécifique de croissance inférieur d'un facteur de 10 aux valeurs

présentées dans la littérature. Un taux spécifique de production de spores de  $0.035 \text{ d}^{-1}$  a été observé.

L'étude des conditions d'inoculation a révélé une concentration critique en inoculum au-delà de laquelle l'accroissement de la masse racinaire tend vers zéro.

La faisabilité de la production de propagules de champignons endomycorhizien à arbuscules en bioréacteur a été démontrée. Cependant, la culture submergée de racines mycorhizées de carotte avec le champignon *G. intraradices* ne semble pas favoriser la production de vésicules.

Un premier outil d'optimisation de la productivité en propagules (spores et vésicules) en bioréacteur a été développé. L'approche a visé le développement d'un bioessai permettant d'évaluer en temps réel les réactions instantanées et en régime établi d'un champignon endomycorhizien à arbuscule face à divers composés et environnements de culture. Une technique de mesure en temps réel du pH cytosolique de champignons endomycorhiziens en culture a été développée avec l'utilisation d'une sonde cytochimique (colorant, le BCECF-AM) et de mesures ratiométriques.

Les paramètres expérimentaux tels le temps de prise en charge du colorant et la concentration optimale en colorant extracellulaire ont été déterminés afin d'effectuer les mesures pH en régime établi sur des cellules vivantes des champignons à arbuscules *Gigaspora margarita* et à arbuscules et à vésicules *G. intraradices*.

En premier lieu, un profil de distribution du pH cytosolique caractéristique a été observé le long des hyphes, peut importe les conditions de culture et le champignon observés. Les premiers 0 à 2  $\mu\text{m}$  d'un apex principal présentent des valeurs pH de 0,3 unité plus acides que les 9,5  $\mu\text{m}$  suivants, et le pH redescend environ à la valeur apicale sur les 250  $\mu\text{m}$  suivants. Ce profil est en accord avec la littérature suggérant une activité métabolique plus intense à l'apex des champignons inhérente à leur croissance apicale. Ce profil supporte l'hypothèse d'une concentration apicale de l'assimilation des nutriments et des pompes à protons. Les observations ont donc été concentrées à l'apex.

La forme de ce profil pH caractéristique a pu être modulée par la modulation des états physiologiques des champignons. Les tubes germinatifs de *G. margarita* ont montré un profil pH apical plus élevé lorsque cultivés en présence de racines de carotte transformées) non-mycorhiziennes. De façon similaire, des hyphes extraracinaires de *G. intraradices* ont montré un profil pH apical supérieur à celui de tubes germinatifs. De plus, l'usage d'une membrane de papier empêchant les racines mycorhizées de pénétrer dans le milieu de culture, recréant les conditions de culture du bioréacteur à gel-papier, a favorisé un pH des hyphes encore plus élevé. Le pH cytosolique peut donc être considéré comme un marqueur physiologique. Les conditions de culture favorisant la production de spores ont entraîné une élévation du pH à 9,5  $\mu\text{m}$  alors que des conditions favorisant la production de vésicules, sur gel-papier, ont entraîné une élévation du pH sur les premier 100  $\mu\text{m}$ .

Les résultats suggèrent que cette technique pourrait être utilisée à titre de bioessai pour l'étude de la perception de signaux (stimulateurs et inhibiteurs) et/ou les phénomènes de  $H^+$ /co-transport de nutriments par les champignons endomycorhiziens.

Un deuxième outil d'optimisation a été développé par la mise au point d'un modèle biocinétique structuré décrivant la culture dualiste du champignon *G. intraradices* sur des racines de carotte transformées. L'étude a été centrée sur l'implication de l'ion phosphate extra et intracellulaire et de la concentration intracellulaire en glucides sur le développement du champignon. Des cultures en milieu minimal (M) liquide en boîte de Pétri ont été réalisées avec des racines non-mycorhizées et mycorhizées pour une plage étendue de concentrations en ion phosphate inorganique (Pi): 0,02; 0,04 (milieu M); 0,12; 0,40 et 1,00 mM  $KH_2PO_4$  (Pi).

Les concentrations initiales en Pi ont modulé le taux de croissance spécifique des racines avec un optimum pour 0,12 mM Pi. La mycorhization des racines a amplifié l'effet de faibles concentrations en Pi sur le taux de croissance spécifique. Le taux spécifique de production de spores du champignon a aussi présenté un optimum pour 0,12 mM Pi.

Les résultats montrent que la structure du modèle dualiste proposé permet de décrire les comportements en culture de racines non-mycorhiziennes et mycorhiziennes. De plus, les paramètres inconnus évalués par le modèle ont été compatibles avec des valeurs physiologiques et mesurées lors des cultures.

Les résultats de simulations du modèle supportent l'hypothèse que le niveau des réserves intracellulaires en Pi des racines représente une clef décisionnelle pour le champignon de croître (réserves = 0) ou de cesser de croître (réserves > 0). De plus, le modèle arrive à prédire les diminutions du taux de croissance des racines mycorhizées par rapport aux racines non-mycorhizées en suggérant que le champignon compétitionne sa racine-hôte pour ses glucides intracellulaires. Ces résultats appuient l'hypothèse proposant que la production des spores du champignon *G. intraradices* est conditionnée par une problématique nutritionnelle. Cependant, les simulations ont révélé un rôle possiblement plus important que prévu pour le nitrate, générant une erreur d'estimé pour les cultures non-mycorhiziennes lors desquelles le nitrate est accumulé. Il est proposé que cet ion soit une deuxième clef décisionnelle. Le modèle développé apparaît donc comme un outil perfectible qui permettra de simuler des conditions environnementales optimisant la productivité en spores en bioréacteur. À notre connaissance, il s'agit de la première tentative à décrire la relation symbiotique en un modèle structuré basé sur des clefs nutritionnelles.

Suite aux cultures en bioréacteur gazo-siphon ayant mis en doute la capacité de produire des vésicules en culture submergée, des travaux d'optimisation de la configuration et de l'opération du bioréacteur ont été entrepris afin de maximiser la production de vésicules. Ces travaux ont été conditionnés par les productions élevées en vésicules et en spores observées en culture compartimentée (Gaudette, 1997).

Un bioréacteur permettant la culture aéronique alimentée en milieu nutritif par atomisation, présenté dans la littérature pour la culture de racines transformées, a été modifié par l'ajout d'un lit de grains de perlite afin de transposer le concept de compartimentation. De plus, l'opération des cultures a été fragmentée en deux étapes : une première étape favorisant la croissance des racines par l'utilisation d'un milieu enrichi suivie d'une deuxième étape limitant leur croissance par l'utilisation d'un milieu minimal.

Ces modifications ont permis d'atteindre les niveaux de productivités en propagules de la culture compartimenté à gel-papier. Les niveaux de production de spores ont été augmentés par un facteur de 50, passant d'environ 5 000 spores par culture en bioréacteur gazo-siphon à près de 280 000 spores par bioréacteur de 1 L opéré en mode brouillard en deux étapes munis d'un lit de perlite. La production de vésicules, pour sa part, est passée de quelques centaines (gazo-siphon) à plus de 80 000 par culture. Cependant, la présence de vésicules par unité de longueur de racine a été de la moitié des niveaux atteints en système à gel-papier. L'objectif d'optimisation de la production de propagules (spores et vésicules) en bioréacteur a été rencontré.

L'ensemble des résultats obtenus suggèrent que le champignon endomycorhizien *Glomus intraradices* doit, dans un premier temps, réaliser une croissance extraracinaire avant d'être en mesure de réaliser une croissance intraracinaire. De

plus, il semble que l'imposition de stress osmotique et nutritionnel favorisera le développement du champignon là où il est rendu dans son cycle de développement.

Un procédé optimisant la production de vésicules devra comporter trois étapes : une première étape favorisant le développement extraracinaire du champignon par l'utilisation d'un milieu minimal, une deuxième étape favorisant l'augmentation de la masse racinaire par un milieu enrichi, puis, une troisième étape avec l'imposition d'un stress limitant la croissance des racines. Par contre, un procédé visant une production maximale de spores n'aura besoin que de la première étape.

La voie est maintenant ouverte pour le développement d'un procédé de production industriel de propagules de champignons endomycorhiziens en bioréacteur. Des travaux sont cependant nécessaires afin d'augmenter le niveau de production de vésicules le long des racines aux valeurs obtenues en bioréacteur à gel-papier.



## RECOMMANDATIONS

Les travaux d'optimisation du procédé de production ont permis d'atteindre des niveaux de production de spores dépassant les productions en système à gel-papier. Par contre, la production de vésicules par unité de longueur racinaire, bien qu'elle ait augmentée significativement, n'a pas dépassée la moitié des performances du système à gel-papier. La compréhension encore partielle des phénomènes impliqués requiert la poursuite des travaux, tant fondamentaux qu'appliqués.

Il est recommandé de poursuivre le développement des outils d'optimisation développés lors de la thèse, ce qui pourra permettre d'améliorer la compréhension des processus de régulation de la relation symbiotique.

Tout d'abord, la technique de mesure en temps réel du pH cytosolique de champignons endomycorhiziens présentée au Chapitre 3 devrait être mise à profit pour les travaux d'optimisation du bioprocédé. Des essais en régime transitoire devraient être réalisés afin de tenter d'appliquer la technique à l'étude des cinétiques et des affinités de consommation des nutriments.

Les résultats présentés au chapitre 3 suggèrent que cette technique pourrait être utilisée à titre de bioessai pour l'étude de la perception de signaux (stimulateurs et inhibiteurs) et/ou les phénomènes de  $H^+$ /co-transport de nutriments par les

champignons endomycorhiziens. Ce bioessai pourra donc permettre ultimement de confronter les champignons à des conditions de culture, de milieux nutritifs, d'exsudats racinaires, de stratégies d'opération des cultures et de sélectionner les conditions générant un état de stimulation désiré du champignon.

Les bases d'un modèle biocinétique a été développé (Chapitre 4). Plusieurs paramètres du modèle doivent être déterminés avec plus de précision avant même prévoir l'incorporer dans des stratégies automatisées de commande du bioréacteur.

La forme de la composante nitrate du taux de croissance spécifique doit être revue afin de tenir compte d'une accumulation en nitrate observée pour les cultures de racines non-mycorhizées. Aussi, les équations reliées aux glucides intraracinaires doivent aussi être précisées afin de décrire les différentes formes d'accumulations possibles (lipides, et.). Le nitrate (ou une autre source d'azote) devrait être évalué comme une clef décisionnelle face à la croissance du champignon en complément du phosphate intraracinaire.

De plus, la composante décrivant le développement des vésicules devrait être incorporée en regards des résultats présentés au chapitre 5 relatifs au niveau de stress nutritionnel de la racine comme le facteur clef impliqué dans la stimulation de la production de vésicules.

Finalement, les travaux d'optimisation du procédé de production en bioréacteur

devraient être poursuivies autour de la configuration munie d'une matrice-support tel que proposé. Les travaux initiés sur la définition d'un milieu de culture permettant d'augmenter rapidement la masse racinaire (mycorhizée) lors d'une première étape devraient être poursuivis. Une attention particulière devrait être portée au glucose, préféré au fructose par les racines.

L'intégrer des outils pH cytosolique, modèle biocinétique et bioréacteur dans le processus d'optimisation du procédé de production ne pourra qu'être synergique.

## RÉFÉRENCES

AGUTTER, P.S., MALONE, P.C. et WHEATLEY, D.N. (1995). Intracellular transport mechanisms: a critique of diffusion theory. J. Theor. Biol., 176, 261-272.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WATSON, J.D. (1994). Cell signaling. Dans: Molecular biology of the cell. Third edition. Garland Publishing, New York, US, 721-787.

AMES, R.N., REID, C.P.P., PORTER, L.K. et CAMBARDELLA, C. (1983). Hyphal uptake and transport of nitrogen from two  $^{16}\text{N}$ -labelled sources by *Glomus mossese*, a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. New Phytol., 95, 381-396.

ANDRADE, G., MIHARA, K.L., LINDERMAN, R.G. et BETHLENFALVAY, G.J. (1997). Bacterial from rhizosphere and hydrosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. Plant Soil, 192, 71-79.

ARORA, D.K., RAI, B., MUKERJI, K.G. et KNUDSEN, G.R. (1991). Handbook of Applied Mycology. Volume 1: Soil and Plants. Marcel Dekker Publisher, New-York, 719 pages.

ASHIHARA, H., TOKORO, T. (1985). Metabolic fate of inorganic phosphate absorbed by suspension cultured cells of *Catharanthus roseus*. J. Plant Physiol., 118, 227-233.

AZCON, A.C., AZCON, R. et BREA, J.M. (1979). Endomycorrhizal fungi and *Rhizobium* as biological fertilizers for *Medicago sativa* in normal cultivation. Nature, 279, 325-327,

BARBER, S.J., TAGU, D. et DELP, G. (1998). Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. Plant Physiol., 116, 1201-1207.

BARTNICKI-GARCIA, S., BARTNICKI, D.D., GIERZ, G., LOPEZ-FRANCO, R. et BRACKER, C.E. (1995). Evidence that spitzenkörper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. Exp. Mycol., 19, 153-159.

BÉCARD, G. et FORTIN, J.A. (1988). Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol., 108, 211-218.

BÉCARD, G. et PICHE, Y. (1989a). New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. New Phytol., 112, 77-83.

BÉCARD, G. et PICHE, Y. (1989b). Fungal growth stimulation by CO<sub>2</sub> and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Appl. Environ. Microbiol., 55, 2320-2325.

BÉCARD, G., DONER, L.W., ROLIN, D.B., DOUDS, D.D. et PFEFFER, P.E. (1991). Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by in vitro <sup>13</sup>C NMR and HPLC analyses. New Phytol., 118, 547-552.

BÉCARD, G., BÉGUIRISTAIN, T. et NAGAHASHIG. (1998). Signalling in plants and root-infecting fungi associations. Dans: Radical Biology: advances and perspectives on the function of plant roots. Volume 18, H.E. Flores, J.P. Lynch and D. Eissenstat Eds, Rockville, Maryland, É.U., 178-187.

BEEVER, R.E. et BURNS, D.J.W. (1980). Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. Dans: Advances in Botanical Research. Volume 8, H.W. Woolhouse Eds, Academic Press, London England, 127-219.

BERBARA, R.L.L., MORRIS, B.M., FONSECA, H.M.A.C., REID, B., GOW, N.A.R. et DAFT, M.J. (1995). Electrical currents associated with arbuscular mycorrhizal interactions. New Phytol., 129, 433-438.

BERTA, G., FUSCONI, A., TROTTA, A. et SCANNERINI, S. (1990). Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E3 in the root system of *Allium porrum* L. New Phytol., 114., 207-215.

BETHLENFALVAY, G.J. (1992). 1. Mycorrhizae and Crop Productivity. Dans: Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. A.S.A Special Publication, 54, 1-27.

BHADRA, R. et SHANKS, J.V. (1995). Statistical design of the effect of inoculum conditions on growth of hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnol. Tech., 9, 681-686.

BIELESKI, R.L. (1973). Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 225-252.

BIELESKI, R.L et FERGUSON, I.B. (1983). Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. Dans: Inorganic plant nutrition: Encyclopedia of plant physiology (New series). A. Lauchi and R.L. Bielecki Eds, Springer-Verlag, Wien, New-York, É.-U., 422-449.

BONFANTE, P. et PEROTTO, S. (1995). Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. New Phytol., 130, 3-21.

BRANDAO, R.L., CASTRO, I.M., PASSOS, J.B., NICOLI, J.R. et THEVELEIN, J.M. (1992). Glucose-induced activation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Fusarium oxysporum*. J. General Microbiol., 138, 1579-1586.

BRAUER, D., OTTO, J. et TU, S.I. (1994). Selective accumulation of the fluorescent pH indicator, BCECF-AM, in vacuoles of maize root-hair cells. J. Plant Physiol., 145, 257-261.

BRUNDRETT, M.C., PICHÉ, Y. et PETERSON, R.L. (1984). A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Can. J. Bot., 62, 2128-2134.

BUWALDA, J.G., ROSS, G.J.S., STRIBLEY, D.P. et TINKER, P.B. (1982). The development of endomycorrhizal root systems. III. The mathematical representation of the spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in root systems. New Phytol., 91, 669-682.

CAPACCIO, L.C.M. et CALLOW, J.A. (1982). The enzymes of polyphosphate metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizas. New Phytol., 91, 81-91.

CHABOT, S., BÉCARD, G. et PICHÉ, Y. (1992). Life cycle of *Glomus intraradix* in root-organ culture. Mycologia, 84, 315-321.



CHAVARIE, C., ARCHAMBAULT, J., PERRIER, M., WILLIAMS, R.D., JOLICOEUR, M., GAUDETTE, M., AUBRY, D., LAVOIE, L., BOUDREAU, M.-J. et BOUCHARD-MARCHAND, É. (1998). Premier rapport scientifique du projet : Développement d'un bioprocédé de production en bioréacteur d'inocula endomycorhiziens. Préparé pour: Premier Tech Ltée. Le centre de développement technologique de l'École Polytechnique.

CLARKSON, D.T., SANDERSON, J. et SCATTERGOOD, C.B. (1978). Influence of phosphate-stress on phosphate absorption and translocation by various parts of the root system of *Hordeum vulgare* L. (Barley). Planta, 139, 47-53.

CLARKSON, D.T. et HANSON, J.B. (1980). The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 31, 239-298.

CLARKSON DT (1985). Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 36, 77-115.

COX, G., MORAN, K.J., SANDERS, F., NOCKOLDS, C. et TINKER, P.B. (1980). Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. New Phytol., 84, 649-659.

CRESS, W.A., THRONEBERRY, G.O. et LINDSEY, D.L. (1979). Kinetics of phosphorus absorption by mycorrhizal and nonmycorrhizal tomato roots. Plant Physiol., 64, 484-487.

DALPÉ, Y. (1995). Systématique des endomycorhizes à arbuscule : de la mycopaléontologie à la biochimie. Dans: La symbiose mycorrhizienne, état des connaissances. J.A. Fortin, C. Charest et Y. Piché (éds), Éditions Orbis, Frelighsburg, Québec, Canada, 1-20.

DEHNE, J. (1982). Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. Phytopathol., 72, 1115-1118.

DELUCIA, E.H., CALLAWAY, R.M., THOMAS, E.M. et SCHLESINGER, W.H. (1997). Mechanisms of phosphorus acquisition for Ponderosa pine seedlings under high CO<sub>2</sub> and temperature. Ann. Bot., 79, 111-120.

DIORIO, A.A., CHEETHAM, R.D. et WEATHERS P.J. (1992). Growth of transformed roots in a nutrient mist bioreactor: reactor performance and evaluation. Appl. Microbiol. Biotechnol., 37, 457-462.

DIOP, T.A., BÉCARD, G. et PICHE, Y. (1992). Long-Term in vitro culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of carrot. Symbiosis, 12, 249-259.

DIXON, G.K., BROWNLEE, C. et MERRETT, M.J. (1989). Measurement of internal pH in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* using 2',7'-bis-(-2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein acetoxymethylester and digital imaging microscopy. Planta, 178, 443-449.

DONER, L.W. et BÉCARD, G. (1991). Solubilization of gellan gels by chelation of cations. Biotech. Techniques, 5, 25-28.

DOUDS, D.D., SCHENCK, N.C. (1990). Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. New Phytol., 116, 621-627.

DOUDS, D.D., GALVEZ, L., BÉCARD, G. et KAPULNIK, Y. (1998). Regulation of arbuscular mycorrhizal development by plant host and fungus species in alfalfa. New Phytol., 138, 27-35.

DREW, M.C., SAKER, L.R., BARBER, S.A. et JENKINS, W. (1984). Changes in the kinetics of phosphate and potassium absorption in nutrient-deficient barley roots measured by a solution-depletion technique. Planta, 160, 490-499.

DUFF, S.M.G., MOORHEAD, C.G.B., LEFEBVRE, D.D. et PLAXTON, W.C. (1989). Phosphate starvation inducible «bypasses» of adenylate and phosphate

dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. Plant Physiol., 90, 1275-1278.

DUGASSA, D.G., GRUNEWALDT-STÖCKER, G. et SCHÖNBECK, F. (1995). Growth of *Glomus intraradices* and its effect on linseed (*Linum usitatissimum* L.) in hydroponic culture. Mycorrhiza, 5, 279-282.

ELIAS, K.S. et SAFIR, G.R. (1987). Hyphal elongation of *Glomus fasciculatum* in response to root exudates. Appl. Environ. Microbiol., 53, 1928-1933.

EPSTEIN, E. (1972). Mineral nutrition of plants. Principles and perspectives. Wiley and Sons, New York.

FILION, M. (1998). Interactions mycorrhizosphériques entre un champignon endomycorhizien arbusculaire (*Glomus intraradices*) et différents microorganismes édaphiques. Mémoire de M.Sc., Université de Montréal, Canada.

FORTIN, J.A., ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., CHAVARIE, C. et JOLICOEUR, M. (1996). Aseptic in vitro endomycorrhizal spore mass production. U.S. Patent 5,554,530.

FRÈRE MARIE-VICTORIN (1964). Flore Laurentienne. Deuxième édition. Les presses de l'Université de Montréal, 272.

GIANINAZZI, S., DEXHEIMER, J., GIANINAZZI-PEARSON, V. et MARX, C. (1983). Role of the host-arbuscule interface in the VA mycorrhizal symbiosis: ultracytological studies of processes involved in phosphate and carbohydrate exchange. Plant Soil, 71, 211-215.

GIANINAZZI-PEARSON, V. (1984). Host-fungus specificity, recognition and compatibility in mycorrhizae. Dans: Plant Gene Research: Genes involved in microbe-plant interactions. D.P.S. Verma and T.H. Hohn Eds, Springer-Verlag, New-York, 225-253.

GIANINAZZI-PEARSON, V., BRANZANTI, B. et GIANINAZZI, S. (1989). In vitro enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. Symbiosis, 7, 243-255.

GIOVANNETTI, M., AVIO, L. et SBRANA, C. (1993a). Factors affecting appressorium development in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe. New Phytol., 123, 114-122.

GIOVANNETTI, M., SBRANA, C. et AVIO, L. (1993b). Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. New Phytol., 125, 587-593.

GLUND, K., NÜRNBERGER, T., ABEL, S., JOST, W., PREISSER, J. et KOMOR, E. (1990). Intracellular Pi- compartmentation during phosphate starvation-triggered induction of an extracellular ribonuclease in tomato cell culture. Dans: Curent plant science and biotechnology in agriculture: Progress in plant cellular and molecular biology. Volume 9, Nijkamp, H.J.J., Van Der Plas, L.H.W. et Van Aartrijk, J. Eds, Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands, 339-342.

GOODAY, G.W. (1993). The dynamics of hyphal growth. Mycol. Res., 99, 385-394.

GOUT, E., BLIGNY, R. et DOUCE, R. (1992). Regulation of intracellular pH values in higher plant cells. Carbon-13 and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies. J. Biol. Chem., 15, 267-287.

GRAHAM, J.H., LEONARD, R.T. et MENGE, J.A. (1981). Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. Plant Physiol., 68, 548-552.

GRIME, J.P. (1977). Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. The Am. Naturalist, 111, 1169-1194.

HALL, I.R. (1978). Soil pellets to introduce vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi into soil. Soil Biol. Biochem., 11, 85-86.

HAMEL, C. (1995). Les endomycorhizes à vésicules et arbuscules en agriculture : chimère ou panacée?. Dans: La symbiose mycorhizienne, état des connaissances. J.A. Fortin, C. Charest et Y. Piché (éds), Éditions Orbis, Frelighsburg, Québec, Canada, 145-164.

HARDIE, K. et LEYTON, L. (1981). The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphate deficient soil. New Phytol., 89, 599-608.

HAROLD, F.M. (1994). Ionic and electrical dimensions of hyphal growth. Dans: The Mycota I: Growth, Differentiation and Sexuality, Wessels-Meinhardt Eds, Springer-Verlag, Berlin, Germany, 89-109.

HARRISON, M.J. et VAN BUUREN, M. (1995). A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. Nature, 378, 626-629.

HETRICK, B.A.D. et BLOOM, J. (1980). The influence of host plant on production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. Mycologia, 79, 32-36.

HILDEBRAND, E.M. (1934). Life history of the hairy-root organism in relation to its pathogenesis on nursery apple trees. J. Agric. Sci., 48, 857-885.

HILTON, M.G. et RHODES, M.J.C. (1990). Growth and hyoscyamine production of hairy roots cultures of *Datura stramonium* in a modified stirred tank reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 132-138.

HOWELER, R.H., CADAVID, L.F. et BURCKHARDT, E. (1982). Response of cassava to VA mycorrhizal inoculation and phosphorus application in greenhouse and field experiments. Plant Soil, 69, 327-339.

HUNG, L.L.L. et SYLVIA, D.M. (1988). Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. Appl. Environ. Microbiol., 54, 353-357.

IMAI, T. et OHNO, T. (1995). The Relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol., 61, 3604-3608.

ISFORT, R.J., CODY, D.B., ASQUITH, T.N., RIDDER, G.M., STUARD, S.B. et LEBOEUF, R.A. (1993). Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation - Implications for the role of hydrogen ions in signal transduction. Eur. J. Biochem., 213, 349-357.

ITOH, S. et BARBER, S.A. (1983). Phosphorus uptake by six plant species as related to root hairs. Agron. J., 75, 457-461.



JACKSON, S.L. et HEATH, I.B. (1993). Roles of calcium ions in hyphal tip growth. Microbiol. Rev., 57, 367-382.

JENNINGS, D.H. (1994). Translocation in mycelia. Dans: The mycota I: Growth, differentiation and sexuality. Wessels-Meinhardt Eds, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 163-173.

JOHNSON, N.C. (1993). Can fertilisation of soil select less mutualistic mycorrhizae? Ecological Applications, 3, 749-757.

JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU, P.J. et ARCHAMBAULT, J. (1992). Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. Biotech. Bioeng., 39, 511-521.

JOLICOEUR, M., GERMETTE, S., GAUDETTE, M., PERRIER, M. et BÉCARD, G. (1998). Intracellular pH in arbuscular mycorrhizal fungi: a symbiotic physiological marker. Plant Physiol., 116, 1279-1288.

KAMINSKYJ, S.G.W. et HEATH, I.B. (1996). Studies on *Saprolegnia ferax* suggest the general importance of the cytoplasm in determining hyphal morphology. Mycologia, 88, 20-37.

KENDRICK, B. (1985). The fifth kingdom. Mycologue Publication. Waterloo, Canada, 241-264.

KHASA, P., FURLAN, V. et FORTIN, J.A., (1990). Effets de différentes espèces de champignons endomycorhiziens sur la croissance de dix espèces de plantes tropicales au Zaïre. Tropicultura, 8, 159-164.

KOIDE, R.T. et SCHREINER, R.P. (1992). Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 43, 557-581.

KONDO, O., HONDA, H., TAYA, M. et KOBAYASHI, T. (1989). Comparison of growth properties of carrot hairy root in various bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 292-294.

KURKDJIAN, A. et GUERN, J. (1989). Intracellular pH, measurement and importance in cell activity. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 40, 271-303.

LEE, R.B. (1982). Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. Ann. Bot., 50, 429-449.

LEE, R.B. et RATCLIFFE, R.G. (1983). Phosphorus nutrition and the intracellular distribution of inorganic phosphate in the pea root tips: a quantitative study using  $^{31}\text{P}$ -NMR. J. Exp. Bot., 34, 1222-1244.

LEE, R.B., RATCLIFFE, R.G. et SOUTHON, T.E. (1990).  $^{31}\text{P}$  NMR measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. J. Exp. Bot., 41, 1063-1078.

LEE, R.B. et RATCLIFFE, R.G. (1993). Subcellular distribution of inorganic phosphate, and levels of nucleoside triphosphate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: measurements with  $^{31}\text{P}$ -NMR. J. Exp. Bot., 44, 587-598.

LEFEBVRE, D.D. et GLASS, A.D.M. (1982). Regulation of phosphate influx in barley roots: effects of phosphate deprivation and reduction of influx with provision of orthophosphate. Physiol. Plant, 54, 199-206,

LEFEBVRE, D.D. et CLARKSON, D.T. (1984). Compartmental analysis of phosphate in roots of intact barley seedlings. Can. J. Bot., 62, 1076-1080.

LEIGH, R.A., POPE, A.J., JENNINGS, I.R. et SANDERS, D. (1992). Kinetics of the vacuolar  $\text{H}^{+}$ -pyrophosphatase. The roles of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates, activators, and inhibitors. Plant Physiol., 100, 1698-1705.

LIU, C., MUCHHAL, U.S., UTHAPPA, M., KONONOWICZ, A.K. et RAGHOTHAMA, K.G. (1998). Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. Plant Physiol., 116, 91-99.

LIVINGSTON, D.P. III et HENSON, C.A. (1998). Apoplastic sugars, fructans, fructan exohydrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. Plant physiol., 116, 403-408.

MACKLON, A.E.S., LUMSDON, D.G., SIM, A. et MCHARDY, W.J. (1996). Phosphate fluxes, compartmentation and vacuolar speciation in root cortex cells of intact *Agrostis capillaris* seedlings: effect of non-toxic levels of aluminium. J. Exp. Bot., 47, 793-803.

McGRATH, V.B., BLAKENEY, A.B. et BATTEN, G.D. (1997). Fructan to nitrogen ratio as an indicator of nutrient stress in wheat crops. New Physiol., 136, 145-152.

McINROY, J.A. et KLOEPPER, J.W. (1994). Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton. Dans: Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms. : Biotechnology and the Release of GMOs. O'Gara F, Dowling D.N., Boesten B., Eds. Weinheim : VCH Verlagsgesellschaft, 19-28.

McKELVEY, S.A., GEHRIG, J.A., HOLLAR, K.A. et CURTIS, W.R. (1993). Growth of plant root cultures in liquid and gas-dispersed reactor environments. Biotechnol. Prog., 9, 317-322.

MERRYWEATHER, J. et FITTER, A. (1995). Arbuscular mycorrhiza and phosphorus as controlling factors in the life history of *Hyacinthoides non-scripta* (L.) Chouard ex Rothm. New phytol, 129, 629-636.

MILLER, R.M. et JASTROW, J.D. (1992). The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. Dans: Mycorrhizae in sustainable agriculture. G.J. Bethlenfalvay et R.G. Linderman (éds), ASA Special Publication, Number 54, Madison, Wisconsin, 29-44.

MORTON, J.B. et BENNY, G.L. (1990). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes), A new order, Glomales, two suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. Mycotaxon, 37, 471-491.

MOSSE, B. et PHILLIPS, J.M. (1971). The influence of phosphate and other nutrients on the development of vesicular-arbuscular mycorrhiza in culture. J. Gen. Microbiol., 69, 157-166.

MOSSE, B. et HEPPEL, C. (1975). Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. Physiological Plant Pathology, 5, 215-223.

MOSSE, B. et THOMPSON, J.P. (1980). Production of endomycorrhizal inoculum by Nutrient Film Technique (NFT). U.K., Patent # GB 2 043 688.

MOSSE, B. et THOMPSON, J.P. (1984). Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. Can. J. Bot., 62, 1523-1530.

MUGNIER, J. et MOSSE, B. (1987). Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in transformed Ri T-DNA roots grown axenically. Phytopathol., 77, 1045-1050.

MUGNIER, J. (1988). Establishment of new axenic hairy root lines by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell Reports, 7, 9-12.

NAGAHASHI, G. et DOUDS, DD. JR. (1996). Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effects on root exudation. Mycorrhiza, 6, 403-408.

NAIR, M.G., SAFIR, G.R. et SIQUEIRA, J.O. (1991). Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. Appl. Environ. Microbiol., 57, 434-439.

NANTAIS, L. (1997). Optimization of arbuscular mycorrhizal inoculum through selection and increased production of *Glomus intraradices* propagules. Mémoire de Maîtrise, Université de Montréal, Canada.

NELDER, J.A. et MEAD, R. (1985). A simplex method for function minimization. Computer J., 7, 308-313.

NEWSHAM, K.K., FITTER, A.H. et WATKINSON, A.R. (1995). Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. TREE, 10, 407-411.

NILSSON, O. et OLSSON, O. (1997). Getting to the root : The role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. Physiologia Plantarum, 100, 463-473.

NOVAK, S., D'AMORE, T. et STEWART, G.G. (1990). 2-Deoxy-D-glucose resistant yeast with altered sugar transport activity. FEBS Letters, 269, 202-204.

NUUTILA, A.M., VESTBERG, M. et KAUPPINEN V. (1995). Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria x Ananassa* Duch.) with arbuscular mycorrhizal fungus. Plant Cell Reports, 14, 505-509.

PACOVSKY, R.S. et FULLER, G. (1986). Development of two endomycorrhizal symbioses on soybean and comparison with phosphorus fertilization. Plant Soil, 95, 361-378.

PATE, J.S. (1975). Exchange of solutes between phloem and xylem and circulation in the whole plant. Dans: Transport in plants. I. Phloem transport. M.H. Zimmermann et J.A. Milburn (éditeurs du volume), A. Pirson et M.H. Zimmermann (éditeurs de la série), Encyclopedia of plant physiology, New Series, Springer-Verlag, Berlin. 451-473.

PAZOUTOVA, S., VOTRUBA, J. et REHACEK, Z. (1981). A mathematical model of growth and alkaloid production in the submerged culture of *Claviceps purpurea*. Biotechnol. Bioeng., 23, 2837-2849.

PERLITE INSTITUTE (1983). Typical chemical and physical properties of perlite. Technical data sheet 1-1, New York, É.-U.

PFEFFER, P.E., SHACHAR-HILL, Y., BÉCARD, G., ROLIN, D. et DOUDS, D.D. JR. (1998). Nutrient transport and metabolism in the life cycle of arbuscular mycorrhizae as examined by NMR spectroscopy. Dans: Radical Biology: advances and perspectives on the function of plant roots. Volume 18, H.E. Flores, J.P. Lynch and D. Eissenstat Eds, Rockville, Maryland, É.U., 178-187.

PLENCHETTE, C., STRULLU, R. (1995). Dans: La symbiose mycorhizienne, état des connaissances. J.A. Fortin, C. Charest et Y. Piché (éds), Éditions Orbis, Frelighsburg, Québec, Canada.

POWELL, C.L. (1976). Development of mycorrhizal infections from endogone spores and infected root segments. Trans. Br. Mycol. Soc., 66, 439-445.

PRESSMAN, B.C. (1976). Biological applications of ionophores. Annu. Rev. Biochem., 45, 501-530.



RAMAKRISHNAN, D., SALIM, J. et CURTIS, W.R. (1994). Inoculation and tissue distribution in pilot-scale plant root culture bioreactors. Biotechnol. Techniques, 8, 639-644.

REES, B., SHEPHERD, V.A., ASHFORD, A.E. (1994). Presence of a motile tubular system in different phyla of fungi. Mycol. Res., 98, 985-992.

REQUENA, N., JIMENEZ, I., TORO, M. et BAREA, J.M. (1997). Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. New Phytol., 136, 667-677.

ROBSON, G.D., PREBBLE, E., RICKERS, A., HOSKING, S., DENNING, D.W., TRINCI, A.P.J. et ROBERTSON, W. (1996). Polarized growth of fungal hyphae is defined by an alkaline pH gradient. Fungal Gen. Biol., 20, 289-298.

RONCAL, T., UGALDE, U.O. et IRASTORZA, A. (1993). Calcium-induced conidiation in *Penicillium cyclopium*: Calcium triggers cytosolic alkalization at the hyphal tip. J. Bacteriology, 175, 879-886.

ROSSMAN, A.Y. (1993). Fungi as part of the national biological survey. Inoculum, 44, 1-5.

RUIZ-LOZANO, J.M., GOMEZ, M. et AZCON, R. (1995). Influence of different *Glomus* species on the time-course of physiological plant response of lettuce to progressive drought stress periods. Plant Science, 110, 37-44.

SALISBURY, F.B. et ROSS, C.W. (1992). Plant Physiology. 4ième édition, Wadsworth Publishers, Belmont, CA, É.-U, 682 pages.

SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J. et AYLING, S.M. (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. Plant Physiol., 116, 447-453.

SCHELLENBAUM, L., MÜLLER, J., BOLLER, T. et WIEMKEN, A. (1998). Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. New Phytol., 138, 59-66.

SIMON, L., BOUSQUET, J. et LÉVESQUE, R.C. et LALONDE, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature, 363, 67-69.

SMITH, S.S.E. (1980). Mycorrhizas of autotrophic higher plants. Biol. Rev., 55, 475-510.

SMITH, S.E. et GIANINAZZI-PEARSON, V. (1988). Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 39, 221-244.

SMITH, S.E., GIANINAZZI-PEARSON, V., KOIDE, R. et CAIRNEY, J.W.G. (1994). Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. Plant Soil, 159, 103-113.

SMITH, S.E. et READ, D.J. (1997). Mycorrhizal Symbiosis, Ed 2, Academic Press, London, England.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., CARON, M. et FORTIN, J.A. (1994). Inhibition of *Pythium ultimum* in roots and growth substrate of mycorrhizal *Tagetes patula* colonized with *Glomus intraradices*. Can. J. Plant Pathol., 16, 187-194.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., VIMARD, B., CARON, M. et FORTIN, J.A. (1995). Altered growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* in an in vitro dual culture system with the vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* growing on *Daucus carota* transformed roots. Mycorrhiza, 5, 431-438.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C. et FORTIN, J.A. (1996). Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an in vitro system in the absence of host roots. Mycol. Res., 100, 332-338.

ST-ARNAUD, M., HAMEL, C., VIMARD, B., CARON, M. et FORTIN, J.A. (1997). Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* in the non-VAM species *Dianthus caryophyllus* by co-culture with *Tagetes patula* companion plants colonized by *Glomus intraradices*. Can. J. Bot., 75, 998-1005.

STRULLU, D.G. et PLENCHETTE, C. (1991). The entrapment of *Glomus* sp. in alginate beads and their use as root inoculum. Mycol. Res. 95, 1194-1196.

SYLVIA, D.M. et HUBBELL, D.H. (1986). Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. Symbiosis, 1, 259-267.

SYLVIA, D.M. et JARSTFER, A.G. (1990). Sheared roots as a VA-Mycorrhizal inoculum and methods for enhancing plant growth. United States Patent # 5,096,481.

SYLVIA, D.M. et JARSTFER, A.G. (1992). Sheared roots inocula of vesicular mycorrhizal fungi. Appl. Environ. Microbiol., 58, 229-232.

TAKIZAWA, N. et TAKAYAMA, S. (1994). The method and culture system for large scale culture of plant roots using aeration-agitation bioreactor: strategies to scale-up. Abstracts of the VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Florence, Italie.

- TAYA, M., YOYOMA, A., KONDO, O., KOBAYASHI, T. et MATSUI, C. (1989). Growth characteristics of plant hairy roots and their cultures in bioreactors. J. Chem. Eng. Japan, 22, 84-88.
- TAYLOR, T.N., REMY, W., HASS, H. et KERP, H. (1995). Fossil arbuscular mycorrhizae from Early Devonian. Mycologia, 87, 560-573.
- TEPFER, D.A. et TEMPÉ, J. (1981). Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium rhizogenes*, souche A4. C.R. Acad. Sc. Paris., 292 (Série III), 153-156.
- THEODOROU, M.E. et PLAXTON, W.C. (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. Plant Physiol., 101, 339-344.
- THOMPSON, J.P. (1986). Soilless culture of vesicular-arbuscular mycorrhizae of cereals: effects of nutrient concentration and nitrogen source. Can. J. Bot., 64, 2282-2294.
- THOMSON, B.D., CLARKSON, D.T. et BRAIN, P. (1990). Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. New Phytol., 116, 647-653.

THORSTEINSSON, B. et TILLBERG, J.E. (1987). Carbohydrate partitioning, photosynthesis and growth in *Lemna gibba* G3. II. Effects of phosphorus limitation. Physiol. Plant, 71, 271-276.

TODA, K. et YABE, I. (1979). Mathematical model of cell growth and phosphatase biosynthesis in *Saccharomyces carlsbergensis* under phosphate limitation. Biotech. Bioeng., 21, 487-502.

TOIVONEN, L. (1993). Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites. Biotechnol. Prog., 9, 12-20.

TORRIANI-GORINI, A., YAGIL, E. et SILVER, S. (1994). Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. American Society of Microbiology, Washington, DC.

TRAPPE, J.M., MOLINA, R. et CASTELLANO, M. (1984). Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. Ann. Rev. Phytopathol., 22, 331-359.

TSIEN, R.Y. (1989). Fluorescent indicators of ion concentrations. Meth. Cell Biol., 30, 127-156.

TURIAN, G., TON-THAT, T.C. et PEREZ, R.O. (1985). Acid tip linear growth in fungi: requirements for  $H^+/Ca^{2+}$  inverse gradients and cytoskeleton integrity. Botanica Helvetica, 95, 311-322.

ULUATAM, S.S. (1991). Assessing perlite as a sand substitute in filtration. Am. Water Works Ass. J., 83,

UOZUMI, N., KOHKETSU, K. et KOBAYASHI, T. (1993). Growth and kinetic parameters of *Ajuga hairy root* in fed-batch culture on monosaccharide medium. J. Chem. Tech. Biotechnol., 57, 155-161.

UOZUMI, N. et KOBAYASHI, T. (1994). Application of Hairy Root and Bioreactors. Dans: Advances in Plant Biotechnology. Ryu and Furusaki Eds, Elsevier, 307-337.

VEIRHEILIG, H. et PICHE, Y. (1995). Facteurs biochimiques potentiellement impliqués dans les interactions entre les champignons endomycorhiziens et leurs plantes non-hôtes. Dans: La symbiose mycorhizienne, état des connaissances. J.A. Fortin, C. Charest et Y. Piché Édts, Édition Orbis, Frelighsburg, Québec, Canada, 109-123.

VOLPIN, H., ELKIND, Y., OKON, Y. et KAPULNIK, Y. (1994). A vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. Plant Physiol., 104, 683-689.

WANG, C. et TILLBERG, J.-E. (1997). Effects of short-term phosphorus deficiency on carbohydrate storage in sink and source leaves of barley (*Hordeum vulgare*). New Phytol., 136, 131-135.

WATERER, D.R. et COLTMAN, R.R. (1988). Phosphorus concentration and application interval influence growth and mycorrhizal infection of tomato and onion transplants. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 113, 704-708.

WATRUD, L.S., HEITHAUS, III J.J. et JAWORSKI, E.G. (1978). Geotropism in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. Mycologia, 70, 449-452.

WELLER, D.M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol., 26, 379-407.

WESSELS, J.G.H. (1993). Tansley Review No. 45: Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. New Phytol., 123, 397-413.

WHITNEY, P.J. (1992). Novel bioreactors for the growth of roots transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. Enzyme Microbiol. Technol., 14, 13-17.

WILSON, J.M. (1984). Comparative development of infection by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol., 97, 413-426.



WILSON, P.D.G., HILTON, M.G., MEEHAN, P.T.H., WASPE, C.R. et RHODES M.J.C. (1990). The cultivation of transformed roots from laboratory to pilot plant, Dans: Current plant science and biotechnology in agriculture. Progress in Plant Cellular and Molecular Biology. H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van der Plas and Van Aartrijk Eds, Kluwer Academic Publishers, 700-705.

WOOD, T. et CUMMINGS, B. (1992). Biotechnology and the future of VAM commercialization. Dans: Mycorrhizae in Sustainable Agriculture. ASA Special Publication, 54, 468-487.

YOSHIDA, S. (1994). Low Temperature-Induced Cytoplasmic Acidosis in Cultured Mung Bean (*Vigna radiata* (L. Wilczek)) Cells. Plant Physiol., 104, 1131-1138.

ZOBEL, R.W., DEI TREDICI, P. et TORREN, J.G. (1976). Method for growing plants aeroponically. Plant Physiol., 57, 344-346.

**ANNEXE I****ÉVALUATION DE LA PRODUCTION DE VÉSICULES**

$$\text{Production de vésicules} = \frac{\# \text{ de sections contenant au moins une vésicule} \bullet \# \text{ moyen de vésicules par section de 2 mm} \bullet \text{Longueur spécifique}}{2 \text{ mm / section}}$$

La longueur spécifique pour les racines transformées de carotte utilisées est égale à  $84 \text{ m} \bullet \text{g}^{-1}$  DW de racines (Gaudette, 1997). De 200 à près de 1000 sections de 2 mm ont été observées pour chacune des cultures correspondant à 0,006 à 0,024 g DW de racines. Lorsque moins de une section sur 10 sections consécutives contenait au moins un vésicule sur plusieurs racines observées, le reste des racines était entièrement observé rapidement sans effectuer le décompte de vésicules ni leur distribution.

**ANNEXE II****PROGRAMMES INFORMATIQUES DÉVELOPPÉS ET UTILISÉS  
AU CHAPITRE 4**

Les simulations ont été effectuées à l'aide du logiciel Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) à partir des programmes présentés à la suite.

## B.1 Le programme d'appel : MINIP

Ce programme contient les valeurs initiales des variables d'état, appelle la fonction à minimiser et sauvegarde les résultats de simulation.

```
clear all
```

```
% Liste des variables globales
```

```
global ct K1 K2 K3 Pirmax Prscrit Srcrit Scrit dpc dsc dpr dsr dnc Kpp inhipr
VmaxIrs KmIrs KmIcs mc mcS Vmaxsc Vmaxirc Vmaxicr Kp Kcep Kces Picmax
inhi Spores Spore parm mr mrS VmaxIce KmIce VmaxIIce KmIIce VmaxIr KmIr
VmaxIir KmIir mini;
```

```
% Valeurs initiales des paramètres et variables reliés aux racines
```

```
K1=9.7437659;      K2=0.17345261;      K3=13.360612;      inhipr=1.9218351;
Kpp=0.91317769;
Pirmax=0.049735373; Prscrit=.1692-Pirmax; Srcrit=.12;
dpr=1; dsr=1.2829086; Ypr=0.027/dpr; Ysr=0.5/dsr; mr=0.00059145299;
mrS=0.00060315959;
VmaxIr=0.0075760938; KmIr=0.0018050707; VmaxIir=0.018795867;
KmIir=1.9963458; VmaxIrs=.044; KmIrs=.8;
```

```
% Valeurs initiales des paramètres et variables reliés au champignon
```

```
Spore=700; inhi=3.2501392; Kp=0.0000000006719846; Kcep=92.467503;
Kces=13.715117; Picmax=0.015; VmaxIce=0.0028331; KmIce=.001;
VmaxIIce=.060; KmIIce=12; Scrit=.12; dpc=23.700903; dsc=5.1065606; dnc=1;
Ypc=0.0592/dpc; Ysc=0.7783/dsc; Ync=2.2799/dnc; mc=0; mrfS=1; mcS=0;
Vmaxirc=0; Vmaxicr=0.0030759087; Vmaxsc=3.0801058; KmIcs=0.0026113679;
```

```
% Initialisation d'un compteur utilisé pour ordonner les cycles de simulation
```

```
ct=0;
```

% Les variables modifiées lors des cycles de minimisation sont déterminées ainsi que les conditions de racines non-mycorhizées (Spore < 0) ou mycorhizées (Spore > 0)

```
if Spore > 0
    para0=[Vmaxsc KmIcs Kces inhi Kcep Kp Vmaxicr dpc dsc];
else
    para0=[Kpp inhipr mr K1 K2 K3 dsr mrS];
end
```

% Appel de la fonction à minimiser en utilisant la sous-routine FMINS.M

```
para=fmins('oksmin2', para0);
```

% Sauvegarde des résultats de simulation

```
save c:résultats.dat parm -ascii
```

## B.2 Le programme de minimisation : OKSMIN2.M

```
function mini=oksmin2(x);
```

```
global ct K1 K2 K3 Picgo Pirmax murmax Prscrit Srcrit Scrit dpc dsc dpr dsr dnc
Kpp inhipr VmaxIrs KmIrs KmIcs mc mcS mrS Vmaxsc Vmaxirc Vmaxicr Kp Kcep
Kces Picmax inhi Spores Spore parm mr VmaxIce KmIce VmaxIIce KmIIce VmaxIr
KmIr VmaxIIr KmIIr mini;
```

```
ct=ct+1;
```

```
if Spore > 0
    Vmaxsc=x(1); KmIcs=x(2); Kces=x(3); inhi=x(4); Kcep=x(5); Kp=x(6);
    Vmaxicr=x(7); dpc=x(8); dsc=x(9);
else
    Kpp=x(1); inhipr=x(2); mr=x(3); K1=x(4); K2=x(5); K3=x(6); dsr=x(7); mrS=x(8);
end
```

```
% Les données expérimentales
```

```
PO4=[.02 .04 .12 1];
```

```
if Spore > 0
```

```
    mureel=[0.0049 0.0228 0.0594 0.0516];
```

```
else
```

```
    mureel=[0.0222 0.041 0.0677 0.0510];
```

```
end
```

```
racreel=[0.0286 0.0299 0.0634 0.0691];
```

```
qcereel=[0.0246 0.035 0.042 0.01];
```

```
Spreel=[3000 3500 7000 3000];
```

```
% Construction du vecteur initial des variables d'état
```

```
for D = 1:4,
```

```
    if D == 1
```

```
    y0 = [0.02 Spore 0.0 PO4(D) 1e-6 1e-6 0.0 1e-5 1e-5 0.0 1 0 0.005 0.001 0.02  
3.3333];
```

```
        mini=0.0;
```

```
    else
```

```
    y0 = [0.02 Spore 0.0 PO4(D) 1e-6 1e-6 0.0 1e-5 1e-5 0.0 3 0 0.005 0.001 0.02 10];
```

```
end
```

```
% Appel de la résolution du système d'équations différentielles
```

```
[t, y]=mji('Quatre21', 0.0, y0, .05, 6000);
```

```
qcemx=0; % taux spécifique maximum de production de spores
```

```
murm=0; % taux spécifique maximum de croissance des racines
```

```
Spmx=0; % production maximum de spores
```

```
rmx=0; % production maximum de racines (masse sèche)
```

```
vec=size(y); nby=vec(1);
```

```
% Calcul des estimés des taux spécifiques maxima de croissance des racines et de la  
production de spores
```

```
for wa = 1:nby,
```

```

qce=0.053*Kp/(Kp+y(wa,7)^inhi)*(1-exp(-Kcep*y(wa,9)))*(1-exp(-Kces*y(wa,14)));
mur=0.24*(1-exp(-K1*y(wa,6)))*y(wa,11)/(K2+y(wa,11))*(1-exp(-
K3*y(wa,13)))*Kpp/(Kpp+y(wa,4)^inhipr);
if qce > qcemx; qcemx=qce; end
if mur > murmx; murmx=mur; end
    if y(wa,2) > Spmx; Spmx=y(wa,2); end
if y(wa,1) > rmx; rmx=y(wa,1); end
end

```

% Calcul de l'erreur entre l'estimé et la donnée expérimentale

```

err(D)=(murm-mureel(D))^2; mumur(D)=murm;
qceerr(D)=(qcemx-qcereel(D))^2; qcex(D)=qcemx;
Sperr(D)=(Spmx-Spreel(D))^2; Spx(D)=Spmx;
Racerr(D)=(rmx-racreel(D))^2; rmax(D)=rmx;

end

```

% Calcul des erreurs d'estimer global pour l'ensemble de la plage en phosphate initial

```

murerr=err(1)+err(2)+err(3)+err(4);
qceerr=qceerr(1)+qceerr(2)+qceerr(3)+qceerr(4);
Sper=Sperr(1)+Sperr(2)+Sperr(3)+Sperr(4);
Racer=Racerr(1)+Racerr(2)+Racerr(3)+Racerr(4);

```

% Calcul de la fonction à minimiser

```

if Spore > 0
    mini=murerr*Sper*Racer
else
    mini=murerr+Racer
end

```

```

murerr=0; murmx=0; qceer=0; Sper=0;

```

% Construction du vecteur résultat



```
parm(ct,:)= [K1 K2 K3 Pirmax murmax Kpp inhiPr inhi Kp Kcep Kces Picmax KmIcs
mc mcS Vmaxsc Vmaxirc Vmaxicr VmaxIce KmIce VmaxIIce KmIIce VmaxIr KmIr
VmaxIir KmIir mr mrS dpc dsc dpr dsr dnc mumur qcex Spx rmax mini];
```

### B.3 Le programme contenant les équations différentielles :

#### QUATRE21.M

```
function dydt=Quatre21(t,y);
```

```
global K1 K2 K3 Pirmax murmax Prscrit Sscrit Scrit dpc dsc dpr dsr dnc Kpp inhiPr
VmaxIrs KmIrs KmIcs mc mcS mrS Vmaxsc Vmaxirc Vmaxicr Kp Kcep Kces
Picmax inhi Spores Spore parm mr VmaxIce KmIce VmaxIIce KmIIce VmaxIr KmIr
VmaxIir KmIir mini;
```

```
dydt = zeros(size(y),1);
```

```
Xr=y(1);Spores=y(2);Ves=y(3);P=y(4);Pr=y(5);Pir=y(6);Prs=y(7);
Pc=y(8);Pic=y(9);Pcs=y(10);NO3=y(11);S=y(12);Sir=y(13);Sic=y(14);V=y(15);S0=y
(16);
```

```
% Paramètres des racines
```

```
Ypr=0.027/dpr; % où dpr est un paramètre d'ajustement par rapport à la
donnée expérimentale obtenue par analyse élémentaire
Ysr=0.5/dsr; % où dsr est un paramètre d'ajustement par rapport à la
donnée expérimentale obtenue par analyse élémentaire
murmax=0.24; Yno3r=1.06; muhydro=0.6117833; Vc=0;
```

```
% Paramètres du champignon
```

```
Ypc=0.0592/dpc; % où dpc est un paramètre d'ajustement par rapport à la
donnée expérimentale obtenue par analyse élémentaire
```

Ysc=0.7783/dsc; % où dsc est un paramètre d'ajustement par rapport à la  
 donnée expérimentale obtenue par analyse élémentaire  
 qcemax=0.053; qcrmax=0.053; Fs=0; Ync=2.2799;

% Un ensemble de tests permettant des plages de valeurs pour les estimés

```

if dpc <= 1; dpc=1; end
if dsc <= 1; dsc=1; end
if dpr <= .1; dpr=.1; end
if dsr <= .1; dsr=.1; end
if dnc <= 1; dnc=1; end
if Kp <= 0; Kp=0; end
if Vmaxirc < 0; Vmaxirc=0; end
if Vmaxicr < 0; Vmaxicr=0; end
if Vmaxsc < 0; Vmaxsc=0; end
if mr < 0; mr=0; end
if mr > 1; mr=1; end
if mc > 1; mc=1; end
if mc < 0; mc=0; end
if Sir < 0; Sir = 0; end
if Sic < 0; Sic = 0; end
if S < 0; S = 0; end
if P < 0; P = 0; end
if Pr < 0; Pr = 0; end
if Pir < 0; Pir = 0; end
if Prs < 0; Prs = 0; end
if Pc < 0; Pc = 0; end
if Pic < 0; Pic = 0; end
if Pcs < 0; Pcs = 0; end
if Spore == 0; Spores=0; end
if Spores < 0; Spores=0; end

```

% Opération de distribution du phosphate intracellulaire

```

if Pr >= Prscrit+Pirmax
    Pr=Prscrit+Pirmax; Prs=Prscrit; Pir=Pirmax;
else
    if Pr >= Pirmax
        Pir=Pirmax; Prs=Pr-Pirmax;

```

```

        else
            Prs=0.0; Pir=Pr;
        end
    end

    if Pc >= Picmax
        Pic=Picmax; Pcs=Pc-Picmax;
    else
        Pcs=0.0; Pic=Pc;
    end

    %
    % Système d'équations différentielles
    %
    % Taux de croissance spécifique des racines

    mur=murmax*(1-exp(-K1*Pir))*NO3/(K2+NO3)*(1-exp(-
    K3*Sir))*Kpp/(Kpp+P^inhpr);

    % Croissance des racines (masse sèche)

    dXrdt=mur*Xr;

    % Test contrant les erreurs d'arrondis sur le nombre de spores et calcul du taux
    spécifique de production de spores

    if Spores > 10
        qce=qcemax*Kp/(Kp+Prs^inhi)*(1-exp(-Kcep*Pc))*(1-exp(-Kces*Sic));
        qcr=qcrmax*(1-exp(-Kcep*Pic))*(1-exp(-Kces*Sir))*Fs;
        if qce < 0; qce = 0; end
        if qcr < 0; qcr = 0; end
        qcr=qcrmax*(1-exp(-Kcep*Pic))*(1-exp(-Kces*Sic))*Fs;
        dSporesdt=qce*Spores; dVesdt=qcr*Ves;
    else
        qce=0; qcr=0; dSporesdt=0; dVesdt=0;
    end

    % Test déterminant si les racines contiennent la concentration maximale en phosphate
    inorganique

```

```

if Prs < Prscrit
    mrr=1;
else
    mrr=0;
end

```

% Disparition du phosphate inorganique du milieu de culture

```

dPdt=-(VmaxIr*P/(P+KmIr)+VmaxIIr*P/(P+KmIIr))*Xr/V*mrr-
(VmaxIce*P/(P+KmIce)+VmaxIIce*P/(P+KmIIce))*Spores*1.917e-7/(V+Vc);

```

```

if Spores > 10
    if Pcs > 0
        if Prs > 0

```

% Variation des concentrations respectives en phosphate inorganique des racines et du champignon pour le cas de réserves non-nulles pour les deux organismes

```

dPcdt=(VmaxIce*P/(P+KmIce)+VmaxIIce*P/(P+KmIIce))-(Ypc+Pc)*(qce)-mc;
dPrdt=(VmaxIr*P/(P+KmIr)+VmaxIIr*P/(P+KmIIr))*mrr-(Ypr+Pr)*mur-mr;
else

```

% Variation des concentrations respectives en phosphate inorganique des racines et du champignon pour le cas de réserves non-nulles pour le champignon

```

dPrdt=(VmaxIr*P/(P+KmIr)+VmaxIIr*P/(P+KmIIr))*mrr-(Ypr+Pr)*mur-
mr+Vmaxicr*Pic*Spores*1.917e-7/Xr;
dPcdt=(VmaxIce*P/(P+KmIce)+VmaxIIce*P/(P+KmIIce))-(Ypc+Pc)*(qce)-
Vmaxicr*Pic-mc;

```

```

    TransP=Vmaxicr*Pic-mc;

```

```

end

```

```

else

```

% Variation des concentrations respectives en phosphate inorganique des racines et du champignon pour le cas de réserves nulles pour le champignon

```

dPrdt=(VmaxIr*P/(P+KmIr)+VmaxIIr*P/(P+KmIIr))*mrr-(Ypr+Pr)*mur-mr-
Vmaxirc*Pir;

```

```

dPcdt=(VmaxIce*P/(P+KmIce)+VmaxIIce*P/(P+KmIIce))-(Ypc+Pc)*(qce)-
mc+Vmaxirc*Pir/Spores/1.917e-7*Xr;
end
else

```

% Variation de la concentration en phosphate inorganique des racines non-mycorhizées

```

    dPcdt=0;
    if Pir > 0
dPrdt=(VmaxIr*P/(P+KmIr)+VmaxIIR*P/(P+KmIIR))*mrr-(Ypr+Pr)*mur-mr;
    else
        dPrdt=0.0;
    end
end

```

```

dPirdt=0;dPrsdt=0;dPicdt=0;dPcsdt=0;

```

% Variation de la concentration en nitrate dans le milieu de culture

```

dNO3dt=-mur*Xr*Yno3r/V-Ync*(qce)*Spores*1.917e-7/(V+Vc);

```

% Glucides : hydrolyse du saccharose fournit dans le milieu de culture

```

if S0 <= 0
    muhydro=0; S0=0;
end

```

```

dS0dt=-muhydro*Xr/V;

```

% Variation de la concentration en glucides dans le milieu de culture : glucose + fructose

```

if Sir < Srcrit
    dSdt=(-dS0dt-VmaxIrs*S/(S+KmIrs)*Xr/V);
else
    dSdt=(-dS0dt-VmaxIrs*S/(S+KmIrs)*Xr/V*0);
end

```

```

if Sir < 0
    Sir=0; dSirdt=0;

```

```
else
```

```
% Variation de la concentration en glucides dans les racines
```

```
    if Sir < Scrit
```

```
        dSirdt=VmaxIrs*S/(S+KmIrs)-(Ysr+Sir)*mur-mrS-  
        Vmaxsc*Sir/(Sir+KmIcs)*Spores*1.917e-7/Xr;
```

```
    else
```

```
        dSirdt=VmaxIrs*S/(S+KmIrs)*0-(Ysr+Sir)*mur-mrS-  
        Vmaxsc*Sir/(Sir+KmIcs)*Spores*1.917e-7/Xr;
```

```
    end
```

```
end
```

```
if Spores > 10
```

```
% Variation de la concentration en glucides dans le champignon
```

```
    if Sic < Scrit
```

```
        dSicdt=Vmaxsc*Sir/(Sir+KmIcs)-(Ysc+Sic)*(qce)-mcS;
```

```
    else
```

```
        dSicdt=Vmaxsc*Sir/(Sir+KmIcs)*0-(Ysc+Sic)*(qce)-mcS;
```

```
    end
```

```
else
```

```
    dSicdt=0;
```

```
end
```

```
% Variation du volume de milieu de culture
```

```
dVdt=-mur*Xr*10/100-.007/120;
```

```
dydt=[dXrdt;dSporesdt;dVesdt;dPdt;dPrdt;dPirdt;dPrsdt;dPcdt;dPicdt;dPcsdt;dNO3dt;  
dSdt;dSirdt;dSicdt;dVdt;dS0dt];
```

## B.4 Le programme de résolution du système d'équations différentielles

```
function [t, y] = mji(f, t0, y0, h, nmax, resul, mod)
```

```
global K1 K2 K3 Pirmax Prscrit Srcrit Scrit dpc dsc dpr dsr Kpp inhipr VmaxIrs
KmIrs KmIcs mc mcS Vmaxsc Vmaxirc Vmaxier Kp Kcep Kces Picmax inhi Spores
Spore parm mr mrS VmaxIce KmIce VmaxIice KmIice VmaxIr KmIr VmaxIir KmIir
mini;
```

```
% Methode de Runge Kutta d'ordre 4 pour les systemes
% d'equations differentielles de la forme y' = f(t,y)
% Programmeur: A. Fortin (10 avril 1996)
% Reference: Analyse numerique pour ingenieurs, A. Fortin,
%           Editions de l'Ecole Polytechnique de Montreal,
%           Section 7.4.2
%
nbeq = size(y0,2);
y0 = y0';
k1 = zeros(nbeq,1);
k2 = zeros(nbeq,1);
k3 = zeros(nbeq,1);
k4 = zeros(nbeq,1);
y = zeros(1,nbeq);
n = 1;
t(1) = t0;
y(1,:) = y0';
while(n <= nmax),
    k1 = h * feval(f,t(n),y0);
    k2 = h * feval(f,t(n)+h/2,y0+k1/2);
    k3 = h * feval(f,t(n)+h/2,y0+k2/2);
    k4 = h * feval(f,t(n)+h,y0+k3);

    if (any(~finite(k1)))(any(~finite(k2)))(any(~finite(k3)))(any(~finite(k4))),
        disp('la fonction n"est pas definie en certains points');
        return;
    end

    y0 = y0 + (1/6) * (k1+2*(k2+k3) + k4);

for AK = 1:16,
    if y0(AK) < 1e-15
        y0(AK)=0;
    end
end
end
```

```
% Distribution du phosphate inorganique intracellulaire
```

```

if y0(5) >= Prscrit+Pirmax
    y0(5)=Prscrit+Pirmax; y0(7)=Prscrit; y0(6)=Pirmax;
else
    if y0(5) >= Pirmax
        y0(6)=Pirmax; y0(7)=y0(5)-Pirmax;
    else
        y0(7)=0.0; y0(6)=y0(5);
    end
end
if y0(8) >= Picmax
    y0(9)=Picmax; y0(10)=y0(8)-Picmax;
else
    y0(10)=0.0; y0(9)=y0(8);
end

```

% Test de la concentration en glucides intracellulaires

```

if y0(13) >= Srcrit
    y0(13)=Srcrit;
end
if y0(14) >= Sccrit
    y0(14)=Sccrit;
end

```

```

    y(n+1,:) = y0';
    t(n+1) = t(n) + h;
    n = n+1;
end

```

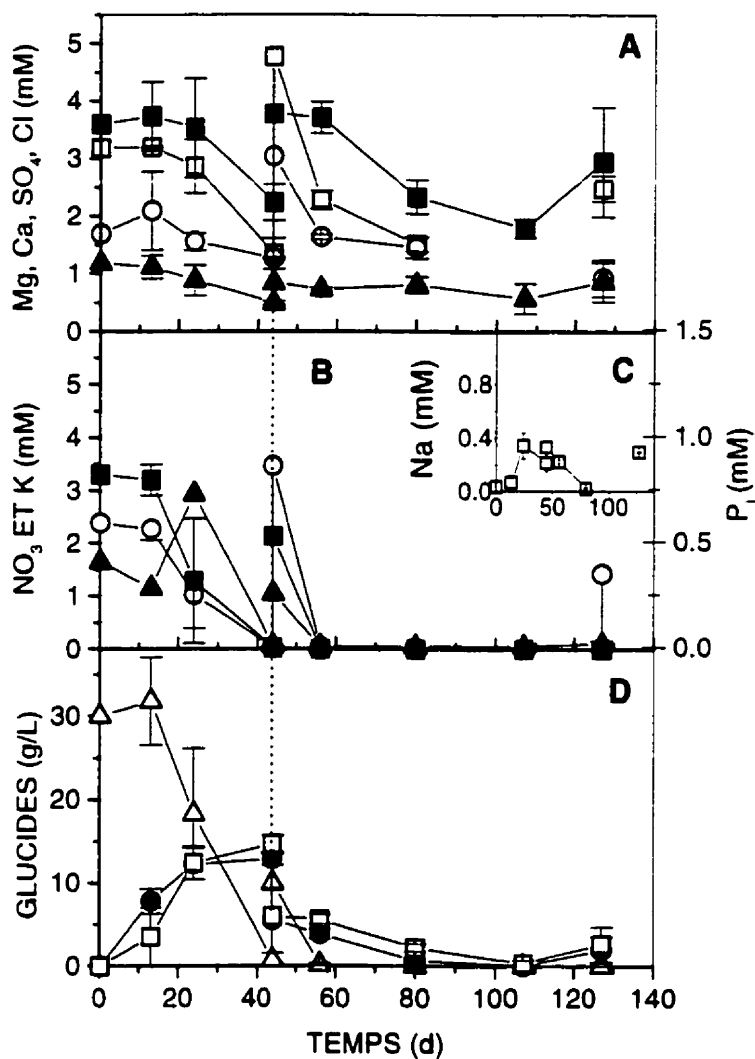
```

if (nargin > 5),
    if (nargin < 7),
        mod = 1;
    end
    eqdout(f, resul, t, y, h, nmax, 'de Runge-Kutta d''ordre 4',mod);
end

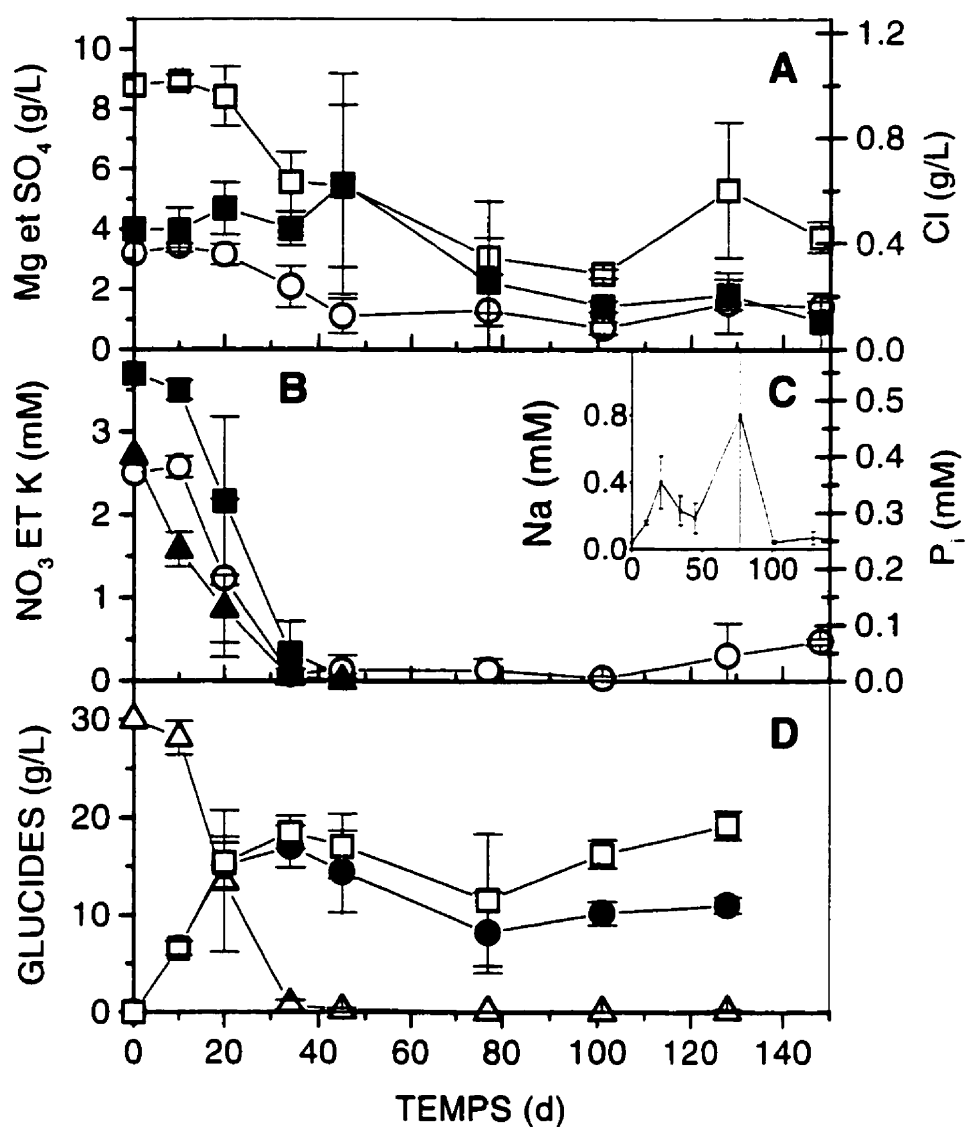
```



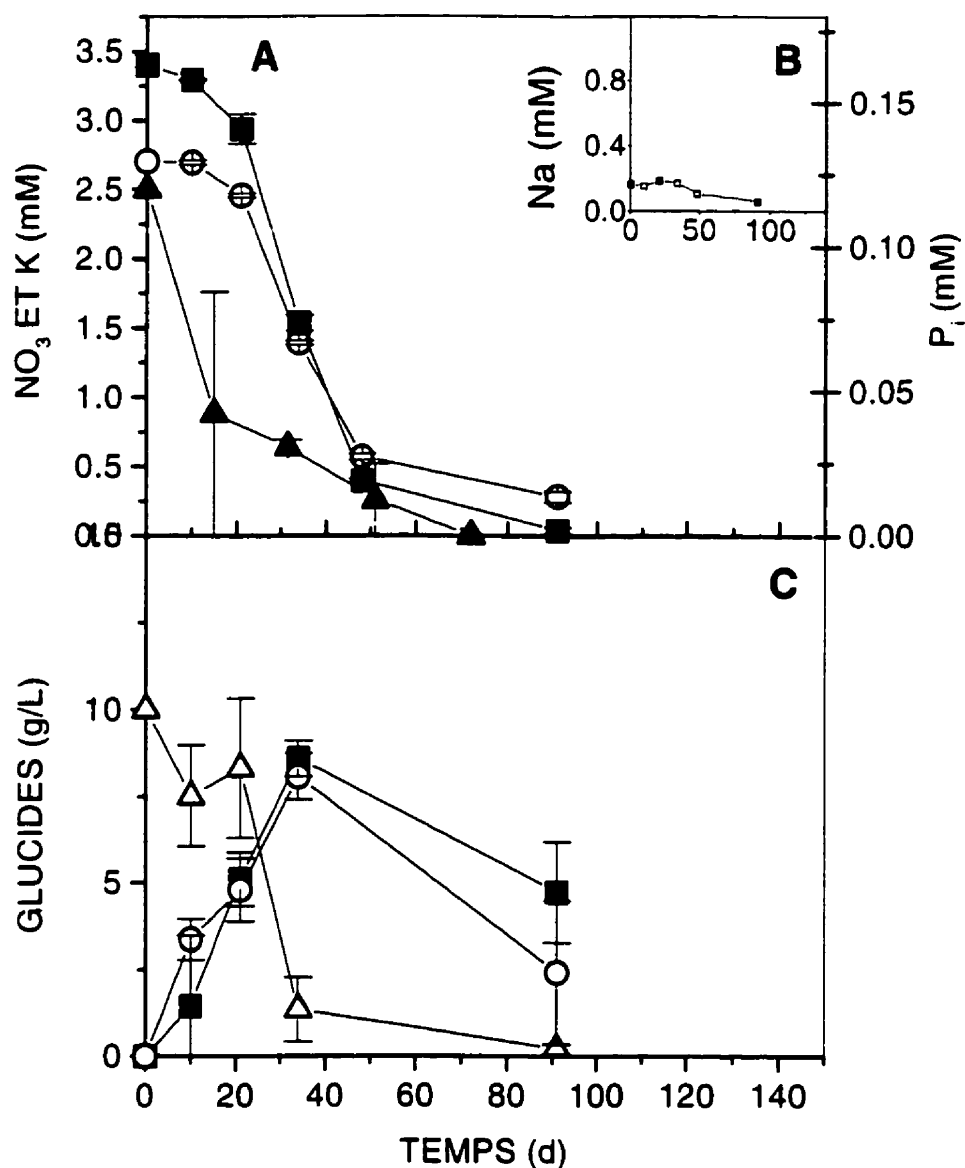
**ANNEXE III**  
**DONNÉES DU CHAPITRE 5**



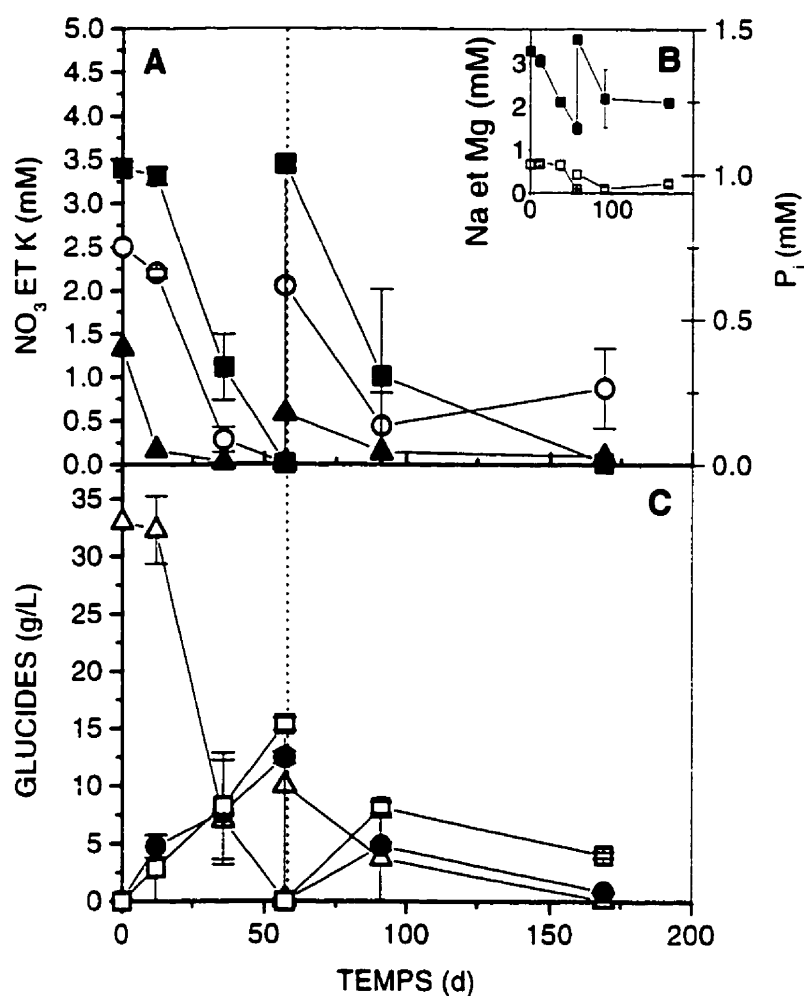
**Figure C.1** Suivi de la consommation des principaux éléments des milieux de culture MW2 et M3P en bioréacteur opéré en mode brouillard en deux étapes. A, Ions : Cl (▲); Ca(○);  $\text{SO}_4$  (■); Mg (□). B, Ions :  $\text{P}_i$  (▲); K(○);  $\text{NO}_3$  (■). C, Glucides : Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (.....). Un inoculum de  $1 \pm 0,2$  g WW par bioréacteur.  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.



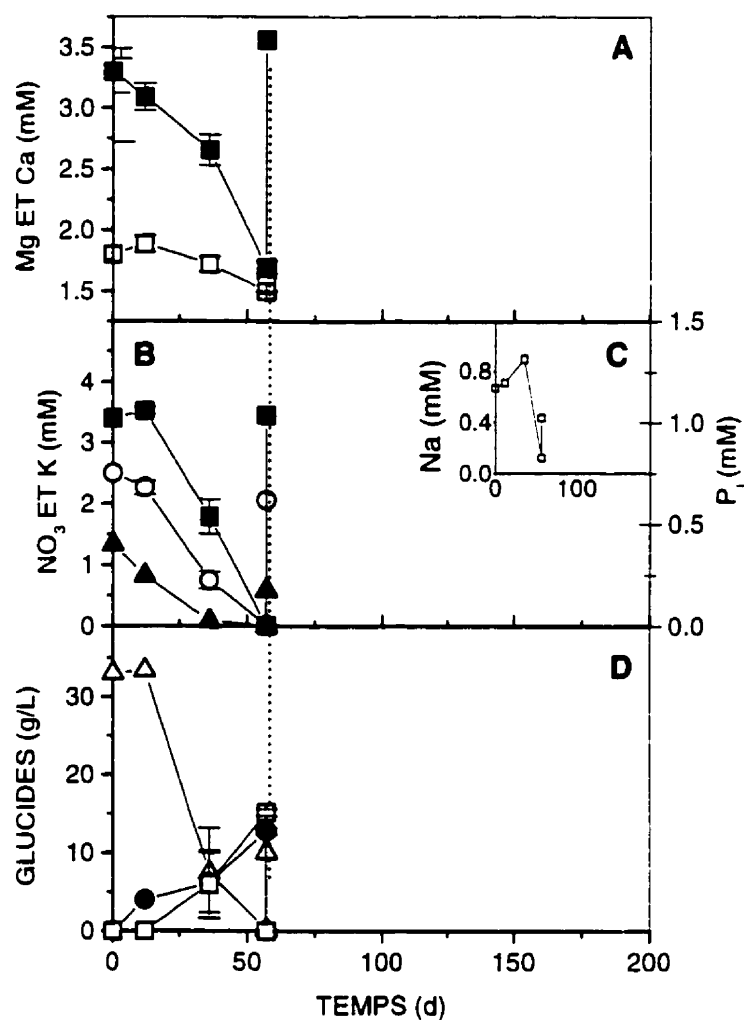
**Figure C.2** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture MW2 en bioréacteur opéré en mode brouillard. A., Ions : Cl (◻); Mg(○); SO<sub>4</sub> (■). B., Ions : Pi (▲); K(○); NO<sub>3</sub> (■). C., Glucides : Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (◻). Un inoculum de  $1 \pm 0,2$  g WW par bioréacteur.  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.



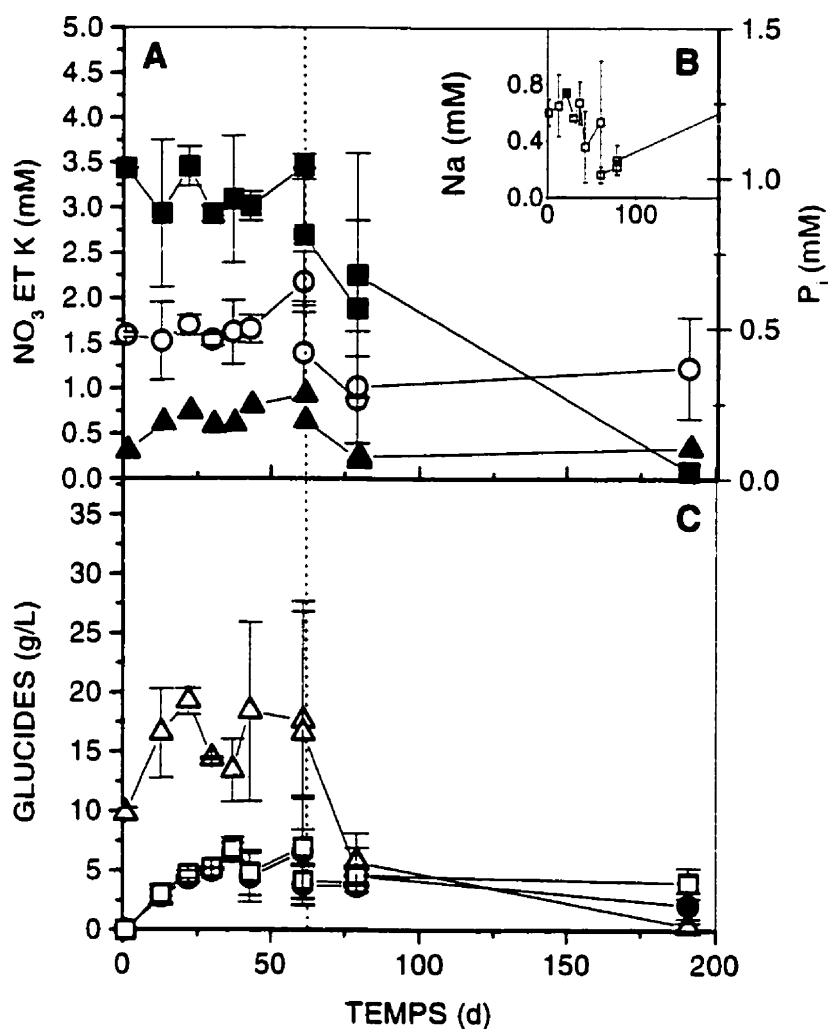
**Figure C.3** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture M3P en bioréacteur opéré en mode brouillard. A., Ions : P<sub>i</sub> (▲); K (○); NO<sub>3</sub> (■). B., Glucides : Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Un inoculum de 1.5 ± 0,2 g WW par bioréacteur. n=3. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.



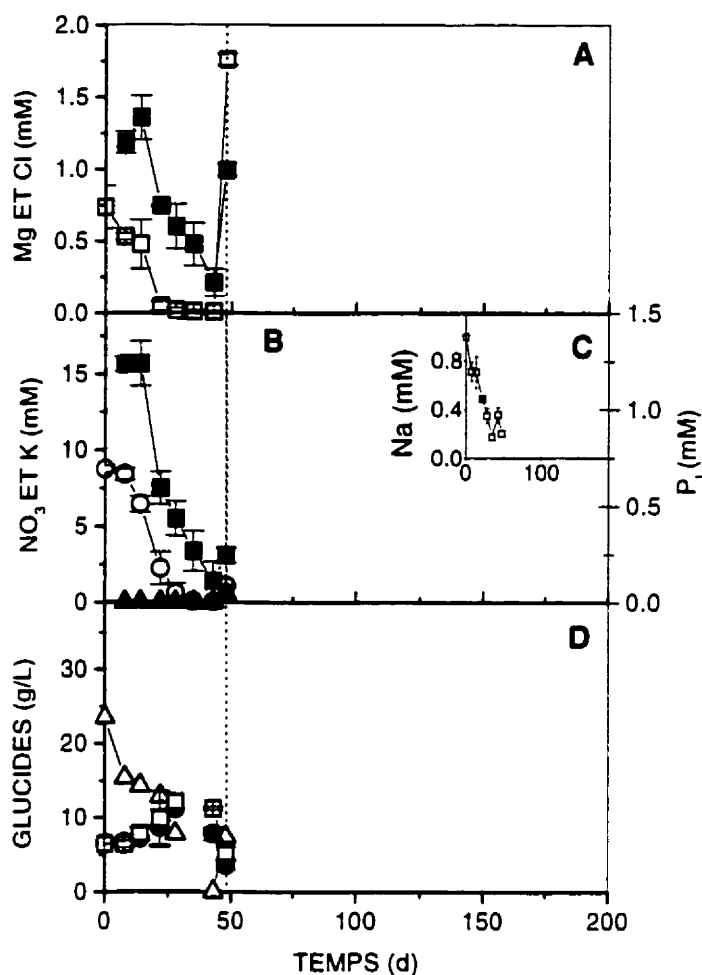
**Figure C.4** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur opéré en mode brouillard en 2 étapes munis d'un lit de perlite non-fractionnée et rincée à l'eau distillée. A,  $\text{P}_i$  (▲); K (○);  $\text{NO}_3$  (■). B, Na (□); Mg (■). C, Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (.....).  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.



**Figure C.5** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur muni d'un lit de perlite non-fractionnée, rincée à l'eau distillée et opéré en mode brouillard à la 1<sup>ière</sup> étape, puis, le milieu liquide a été retiré tout en maintenant l'alimentation des gaz. A, Pi (▲); K(○); NO<sub>3</sub> (■). B, Ca (□); Mg (■). C, Na (□); D, Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (.....). n=3. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.

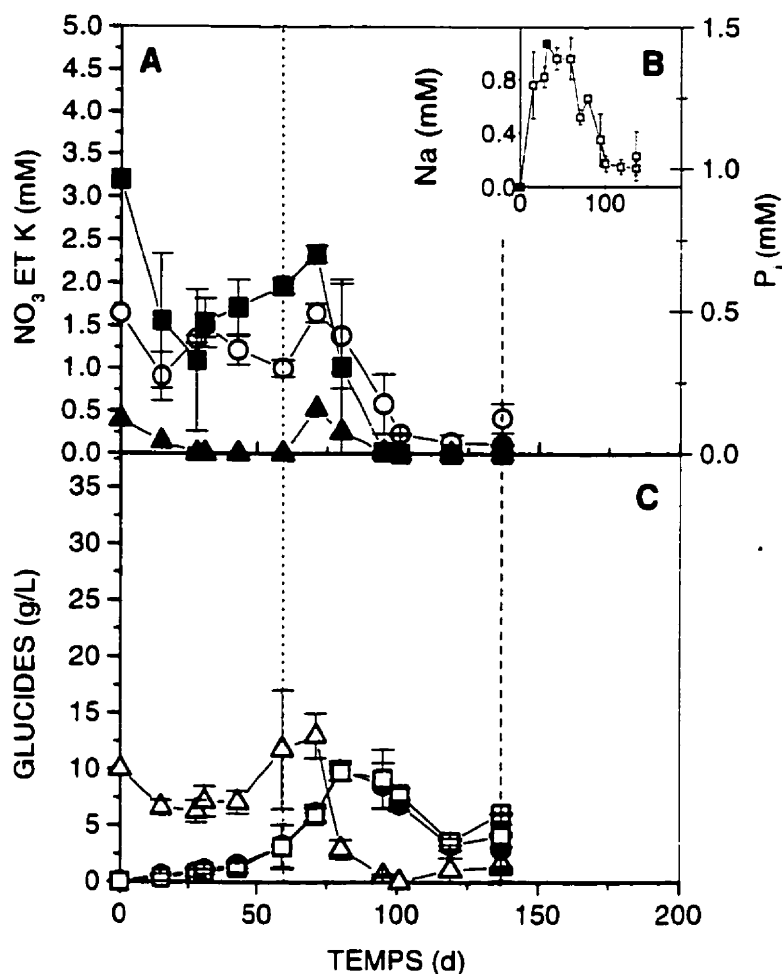


**Figure C.6** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur munis d'un lit de perlite fractionnée à 0,595 mm, non-rincée à l'eau distillée et opéré en mode brouillard en deux étapes. A,  $\text{P}_i$  ( $\blacktriangle$ ); K ( $\circ$ );  $\text{NO}_3$  ( $\blacksquare$ ). B, Na ( $\square$ ); C, Saccharose ( $\triangle$ ); Glucose ( $\bullet$ ); Fructose ( $\square$ ). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (.....).  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.



**Figure C.7** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur munis d'un lit de perlite fractionnée à 0,595 mm, rincée dans une solution aqueuse à 5 mM  $KNO_3$  et opéré en mode brouillard à la 1<sup>ère</sup> étape, puis, le milieu liquide a été retiré tout en maintenant l'alimentation des gaz. A,  $P_i$  (▲); K (○);  $NO_3$  (■). B, Cl (□); Mg (■). C, Na (□); D, Saccharose (Δ); Glucose (●); Fructose (□). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (.....).  $n=3$ . Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.





**Figure C.8** Suivi de la consommation des principaux éléments du milieu de culture en bioréacteur munis d'un lit de perlite non-fractionnée, rincée à l'eau distillée et opéré en mode brouillard en 3 étapes. A,  $\text{P}_i$  ( $\blacktriangle$ ); K ( $\circ$ );  $\text{NO}_3$  ( $\blacksquare$ ). B, Na ( $\square$ ); C, Saccharose ( $\Delta$ ); Glucose ( $\bullet$ ); Fructose ( $\square$ ). Remplacement du milieu M3P pour MW2 (.....). Remplacement du milieu MW2 par le milieu M3P (- - -). n=3. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type.